

Aus dem Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. A. Pospischil

Arbeit unter der Leitung von Dr. N. Borel

**Validierung des ArrayTube-Mikrochip als neue diagnostische Methode
zur Chlamydiendetektion und Chlamydienidentifizierung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

Evelyne Winter-Kempf

Tierärztin
von Altdorf UR

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. A. Pospischil, Referent
Prof. Dr. R. Hoop, Korreferent

Zürich 2006
Zentralstelle der Studentenschaft

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung

II Einleitung

III Literaturübersicht

1. Taxonomie, Morphologie und Entwicklungszyklus der Chlamydien.....	11
2. Chlamydien als Krankheitserreger bei Mensch und Tier	13
3. Diagnostische Methoden	15
3.1. Anzüchtung.....	16
3.2. Ausstrich	17
3.3. Antigennachweis (ELISA)	17
3.4. Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz (IF).....	17
3.5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	18
4. Chip-Technologie	19
4.1. Allgemeines über Chip-Technologien	19
4.2. ArrayTube-System (Clondiag)	22

IV Eigene Untersuchungen

1. Verwendete Kits, Chemikalien und Lösungen	26
2. Untersuchungsmaterial	27
2.1. Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe.....	27
(i) Chlamydien-positive Fälle	27
(ii) Chlamydien-negative Fälle	28
(iii) Zellpellets und Zellkulturen (Monoinfektionen, Misch- und Mehrfachinfektionen)	28
2.2. Frischmaterial: Tupfer und Milchproben	29
2.3. Bakterienstämme	30
2.4. Verdünnungsreihen von Chlamydien-DNA in Wasser und Ejakulaten....	31

3. Methoden.....	31
3.1. Entparaffinierung und DNA-Extraktion.....	31
3.2. ArrayTube (AT) assay.....	32
- PCR und Biotinylierung.....	32
- Konditionierung des Tube.....	32
- Vorbereitung der Probe.....	33
- Hybridisierung der Probe.....	33
- Konditionierung	33
- Blockierung.....	33
- Konjugation.....	33
- Entwicklung, Messung und Auswertung auf dem ATR-01.....	34
- Bewertung der Hybridisierungsmuster	34
- Interpretation und Auswertung der erhaltenen Daten.....	35
3.3. 16S rRNA PCR	38
3.4. IGS-S PCR	38
3.5. IGS-L PCR	38
3.6. Real-time PCR.....	39
3.7. Immunhistochemie für Chlamydien.....	39
3.8. Gelelektrophorese, DNA-Aufreinigung und Sequenzierung	39
4. Statistische Analysen.....	40

V Resultate

1. Vorbemerkungen	41
2. Resultate formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe	42
2.1. Chlamydien-positive Fälle	42
2.2. Chlamydien-negative Fälle	47
2.3. Zellpellets und Zellkulturen	51
3. Resultate Frischmaterial: Tupfer und Milchproben	55
4. Resultate Bakterienstämme	62
5. Resultate Verdünnungsreihen.....	64
6. Statistische Auswertungen.....	65

VI Diskussion

VII Referenzliste

VIII Danksagung

IX Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
Aqua bidest	bidestilliertes Wasser
AT	ArrayTube®
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Chlamydia</i>
ca.	circa
Cp.	<i>Chlamydophila</i>
d.h.	das heisst
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Elementarkörperchen
et al.	et alteri: und andere
Fet.	Fetal
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
h	Stunde(n)
HRP	Horse-Radish-Peroxidase
ID	Identifikation
IGS	engl.: intergenetic space
IHC	Immunhistochemie
Interst.	Interstitielle(r)
IVPZ	Institut für Veterinärpathologie Zürich
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
Konz.	Konzentration
LCR	engl.: Ligase-Chain-Reaction (Ligase-Ketten-Reaktion)
LGV	Lymphogranuloma venerum
Ls	Linse
Lsg.	Lösung
M	molar (Mol/Liter)
min	Minuten
MM	Mastermix (Premix)
Ms	Meerschweinchen
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ Gramm)
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ Liter)
n.b.	nicht beurteilbar
nekr.	nekrotisch
ng	Nanogramm (10 ⁻⁹ Gramm)
Nr.	Nummer
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
Pos.	Position
RK	Retikularkörperchen
rRNA	ribosomale RNA
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden

SDS	Natriumdodecylsulfat
spec.	Spezies
ssp.	Subspezies
SSC	sodium chloride sodium citric acid
SSPE	sodium chloride sodium phosphate EDTA
t	engl.: template (zu amplifizierende Ziel-DNA)
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethylpropandiol
u.a.	unter anderem
uncult. Chlam.	Uncultured Chlamydiales
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

I Zusammenfassung

Obwohl die Mikroarray-Technologie in mRNA-Expressionsanalysen zur Analyse von Gentranskriptionsmuster ein weit verbreitetes Mittel ist, wird sie bei der schnellen Diagnose von Pathogenen wie Bakterien und Viren noch nicht so häufig angewendet. Bis jetzt sind ungenügende Sensitivität bei der Detektion und hohe Kosten der Geräte der Hauptfaktor der eine Weiterverbreitung der Mikroarrays beim Testen der klinischen Proben im grossen Stil verhindern. Das ArrayTube-System repräsentiert eine flexible und kostengünstige Plattform mit integriertem Mikrochip am Boden eines 1,5-ml Reaktionsröhrchens aus Plastik.

In der vorliegenden Studie wurde die neue Methode des ArrayTube®-Mikroarray-Systems für die Routinediagnostik zur Detektion und Identifizierung von *Chlamydia*- und *Chlamydophila*-Spezies etabliert. Das AT-System wurde mit anderen Diagnostikverfahren verglichen. Als Hauptreferenzmethode wurde die 16S-rDNA PCR, modifiziert nach Everett et al., 1999, herangezogen. Als weitere Referenzmethoden dienten die IGS-S-, IGS-L-PCR, die 23S-DNA-Real-Time-PCR und die Immunhistologie (IHC).

Es wurde einerseits formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe, Zellkulturen und Zellpellets und andererseits Frischmaterial (Nasen- und Augentupfer und Milchproben) untersucht. Zur Sensitivitäts- und Spezifitätsstudie wurde DNA von anderen Bakterien und DNA von *Cp. abortus* in Wasser und Ejakulaten als Verdünnungsreihen untersucht. Total wurden 340 Proben, davon 236 klinische Proben von Mensch und Tier mit dem AT untersucht.

Der Vorteil der Methode des AT gegenüber vielen anderen in der Studie beschriebenen Methoden ist die zeitsparende und einfache Handhabung und der günstige Preis einer einzelnen Untersuchung. Weitere Vorteile sind die sehr hohe Sensitivität und Spezifität.

Der Test kann in einem einzigen Tag durchgeführt werden und umfasst die DNA-Extraktion mit einem kommerziellen Kit, Amplifikation und Biotinylierung der Ziel-DNA, die Hybridisierung auf dem Chip und die Signal-Auswertung.

Der Vergleich des Mikroarrays mit der Real-time PCR, konventionellen PCR-Protokollen und auch mit der Immunhistochemie und anderen Testen zeigte einen hohen Grad an Konkordanz. Zudem ist der AT in der Lage auch Mischinfektionen mit zwei oder mehr Chlamydienspezies in klinischen Proben und experimentell infizierten Zellkulturen zu detektieren. Die errechnete mittlere Sensitivität des Systems war 0.81 ($n = 236$) und ist vergleichbar mit der Real-time PCR oder der konventionellen 16S PCR.

Summary

While DNA microarrays have become a widely accepted tool for mRNA expression monitoring in gene transcription analysis, their use in rapid diagnosis of bacterial and viral pathogens is only emerging. So far, insufficient sensitivity of detection and high costs of equipment have been the major limiting factors preventing more widespread use of microarray platforms in direct testing of clinical samples. In the present study, a total of 340 samples, among them 236 clinical specimens from animals and humans, were examined by the ArrayTube™ (AT) DNA microarray assay to detect chlamydial DNA and identify the species of *Chlamydia* and *Chlamydophila* involved. Samples included nasal and conjunctival swabs, formalin-fixed, paraffin-embedded and fresh organ tissue, milk, feces and cell culture. Comparison of microarray findings with real-time PCR, conventional PCR, as well as immunohistochemistry and other tests, revealed satisfactory parameters of accuracy and performance for the new test. Notably, the AT test was shown to detect mixed infections in both clinical samples and experimentally infected cell culture. The calculated median sensitivity of 0.81 over the entire panel of clinical samples was comparable to conventional 16S PCR. Altogether, the data demonstrate the suitability of this DNA microarray assay for routine diagnosis.

II Einleitung

Chlamydien sind als Erreger einer Vielzahl unterschiedlichster Krankheitsbilder bei Mensch und Tier bekannt (Schachter, 1988; Storz, 1988; Schachter, 1999). In der Schweiz spielt vor allem der Chlamydienabort bei Schaf und Ziege bedingt durch *Chlamydia abortus* eine wichtige Rolle als Verursacher von grossen wirtschaftlichen Schäden (Thoma et al., 1997a; Borel et al., 2002; Chanton-Greutmann et al., 2002; Borel et al., 2004).

Daneben finden sich Chlamydien aber auch als Erreger von respiratorischen, urogenitalen, enteralen und konjunktivalen Infektionen bei verschiedenen Tierarten (Schwein, Rind, Katze, Pferd, Vogel, Meerschweinchen, Reptilien und Amphibien) (Longbottom and Coulter, 2003).

Einige der Spezies sind auf den Menschen übertragbar und können Aborte bei der schwangeren Frau (*Chlamydia abortus*) oder schwere Pneumonien (*Chlamydia psittaci*) auslösen (Buxton, 1986; Oldach et al., 1993; Vanrompay et al., 1995; Jorgensen, 1997; Rodolakis et al., 1998; Everett et al., 1999; Aitken, 2000; Pospischil et al., 2002a). Bei anderen Chlamydienpezies ist ein Zoonosepotential möglicherweise vorhanden, jedoch noch nicht bewiesen (Longbottom and Coulter, 2003).

Eine genaue und schnelle Diagnose der Chlamydienpezies ist also nicht nur für die betroffene Tierart oder den Bestand von äusserster Wichtigkeit, sondern auch zum Schutze des Menschen vor einer allfälligen zoonotischen Infektion.

Zurzeit stehen zum direkten Erregernachweis verschiedene diagnostische Methoden zu Verfügung (Anzüchtung, Ausstrich, Immunhistologie, PCR), welche aber abhängig vom Probenmaterial nicht immer den Anforderungen einer sensitiven und spezifischen Diagnose genügen (Stamp et al., 1950; Butty-Favre and Nicolet, 1987; Rodolakis, 1988; Aitken, 2000; Creelan and Mc Cullough, 2000; Aitken, 2004).

Ziel des vorliegenden Projektes ist es eine neue diagnostische Methode zu validieren, welche eine schnelle und zuverlässige Detektion und Speziesidentifikation von *Chlamydia* und *Chlamydia* in verschiedenen tierischen Proben ermöglicht: das Mikroarray-System (ArrayTube) der Firma CLONDIAG (www.clondiag.com). Diese neue Methode ist einfach in der Handhabung und erfordert keine zusätzliche Ausrüstung im Routinelabor. Anhand von am nationalen Referenzlabor für Chlamydienabort bei Schaf und Ziege (IVPZ) bereits vorhandenem Probenmaterial soll die ArrayTube Mikroarray Technik zur Chlamydienidentifikation und -differenzierung validiert werden.

III Literaturübersicht

1. Taxonomie, Morphologie und Entwicklungszyklus der Chlamydien

Die Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila* gehören zur Familie der *Chlamydiaceae* und zur Ordnung der *Chlamydiales*.

Nach den neueren phylogenetischen Untersuchungen am 16S und 23S Gen der Chlamydien (Everett et al., 1999) wird die Ordnung der Chlamydiales in 4 Familien unterteilt:

Ordnung	Familie	Genus	Spezies
Chlamydiales	Chlamydiaceae	Chlamydophila	<i>Cp. abortus</i> <i>Cp. psittaci</i> <i>Cp. felis</i> <i>Cp. caviae</i> <i>Cp. pecorum</i> <i>Cp. pneumoniae</i>
		Chlamydia	<i>C. trachomatis</i> <i>C. suis</i> <i>C. muridarum</i>
	Parachlamydiaceae		<i>N. hartmanellae</i> <i>P. acanthamoebae</i>
	Waddliaceae		<i>W. chondrophila</i>
	Simkaniaceae		<i>S. negevensis</i>

Abbildung 1: Ordnung der Chlamydiales (Modifiziert nach Everett et al., 1999)

Die Chlamydien gehören zu den obligat intrazellulären Bakterien. Da sie ATP nicht selbst produzieren können, müssen sie dieses von der Wirtszelle beziehen (Energieparasiten) (Becker, 1978).

Sie besitzen eine den gram-negativen Bakterien ähnliche Zellwand, jedoch fehlt ihnen die Peptidoglykanschicht (Barbour et al., 1982; Rockey et al., 2000).

Ihr Entwicklungszyklus ist unter den Bakterien einzigartig. Anfangs existieren sie in ihrer infektiösen Form als Elementarkörperchen (EK). Diese sind 200-350 nm gross und hauptsächlich extrazellulär anzutreffen. Wird eine Zelle durch ein EK infiziert, entwickeln sich diese zu Retikularkörperchen (RK). Ihre Grösse variiert von 500-1000 nm. Solch ein RK ist nun teilungsfähig aber nicht mehr infektiös. Während der Replikationsphase der RK dient

die infizierte Zelle als Lieferant für ATP, Nukleotide und andere für die Teilung der RK nötigen Stoffe. Bis zur erneuten Umwandlung in EK und deren Freisetzung durch Bersten der Wirtszelle oder Exozytose der EK verstreichen ca. 48-72 h. Der Entwicklungszyklus ist in der Abbildung 2 schematisch aufgezeigt.

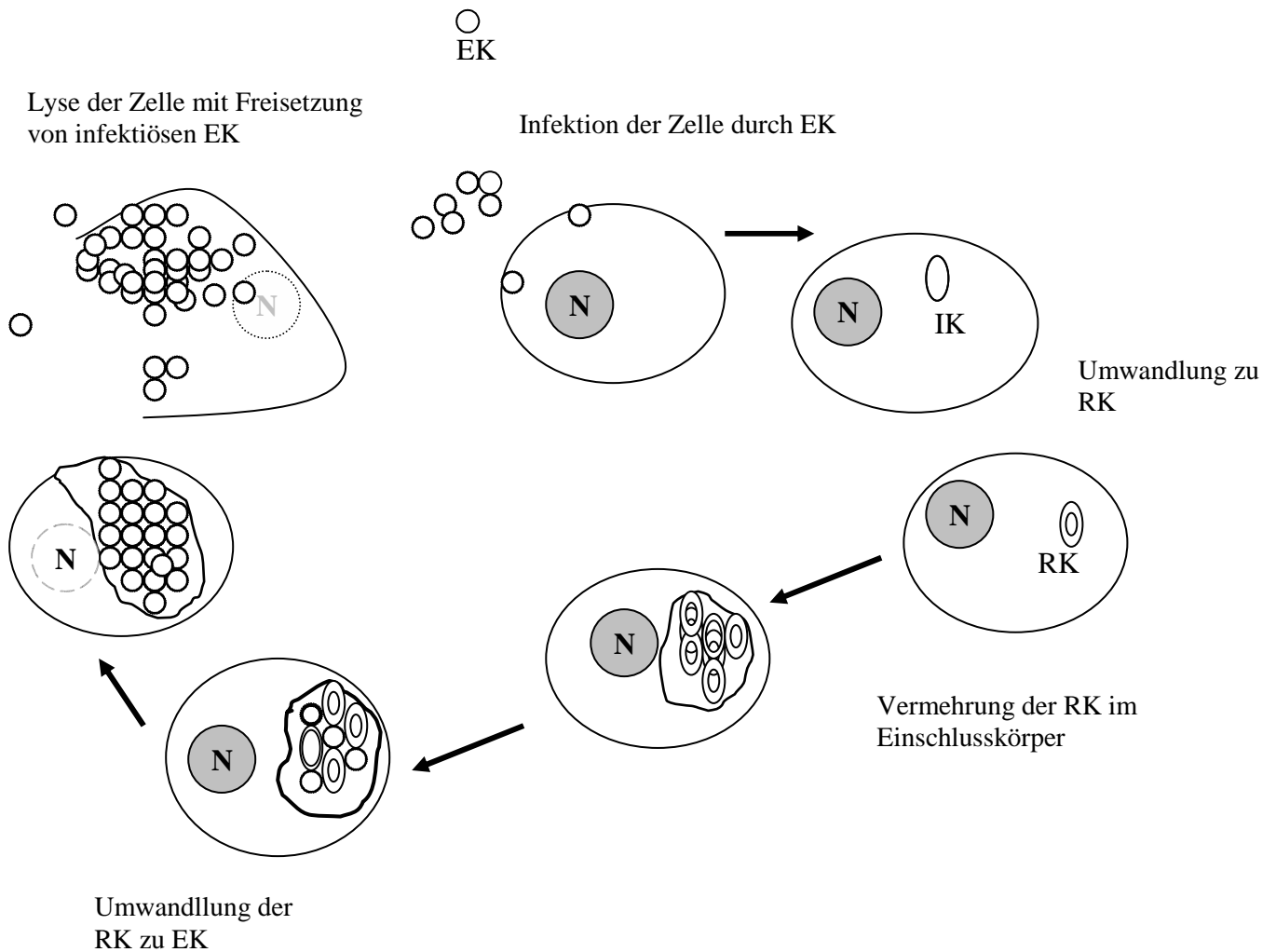


Abbildung 2: Schematischer Entwicklungszyklus der *Chlamydiaceae*

EK: Elementarkörperchen; IK: Intermediärkörperchen; N: Nukleus; RK: Retikularkörperchen

Das Genom der Chlamydien ist eines der kleinsten unter den Bakterien (zirka 1.1×10^6 Basenpaare) (Kingsbury, 1969; Sarov und Becker, 1969; Frutos et al., 1989). Die DNA ist doppelsträngig und von zirkulärer Form.

2. Chlamydien als Krankheitserreger bei Mensch und Tier

Chlamydien sind weltweit verbreitet und Verursacher von verschiedenen Krankheitskomplexen bei Mensch, Tier und Vogel (Schachter, 1988; Storz, 1988; Schachter, 1999; Longbottom and Coulter, 2003) :

Chlamydia trachomatis kommt beim Menschen vor allem in der dritten Welt vor und verursacht schwerwiegende Infektionen des Auges, das so genannte Trachom, der häufigsten Ursache für erworbene Blindheit in der heutigen Zeit. Ebenso ist dieser Erreger verantwortlich für die häufigste sexuell übertragene Krankheit, dem Lymphogranuloma venerum, das zwar zu Beginn subklinisch verläuft, später bei Frauen aber häufig zu Sterilität führt (Schachter, 1988; Dean, 1999; Schachter, 1999).

Auch *Chlamydophila pneumoniae* spielt beim Menschen eine wichtige Rolle als Ursache für atypische Pneumonien, wurde aber neuerdings auch in atherosklerotischen Gefässen und im Gehirn von an Morbus Alzheimer erkrankten Menschen gefunden (Saikku et al., 1985; Saikku et al., 1988; Saikku, 1999; Schachter, 1999; Kinoshita, 2004).

Beim Tier spielt in der Schweiz vor allem der durch *Chlamydophila abortus* hervorgerufene Chlamydienabort bei Schaf und Ziege eine bedeutende wirtschaftliche Rolle. In einer Untersuchung an Abortmaterial von Schaf und Ziege konnte gezeigt werden, dass Chlamydien die häufigste infektiöse Ursache beim kleinen Wiederkäuer in der Schweiz darstellen (Thoma et al., 1997a; Borel et al., 2002; Chanton-Greutmann et al., 2002; Borel et al., 2004). Von *Chlamydophila abortus* geht aber auch ein potentielles Zoonoserisiko aus (Buxton, 1986; Jorgensen, 1997; Rodolakis et al., 1998; Everett et al., 1999; Aitken, 2000; Pospischil et al., 2002a; Longbottom and Coulter, 2003). In diesem Zusammenhang ereignete sich ein tragischer Fall im Kanton Graubünden, wo eine schwangere Frau nach Kontakt mit Chlamydien infiziertem Ziegenabortmaterial selber einen Abort erlitt (Pospischil et al., 2002a). Chlamydienbedingte Aborte können auch sporadisch bei Rind und Schwein auftreten, wobei die Bedeutung beim Rind in der Schweiz geringer zu sein scheint als beim kleinen Wiederkäuer (Storz, 1988; Szeredi et al., 1996; Thoma et al., 1997b; Busch et al., 2000; Pospischil et al., 2002b; Longbottom, 2004; Camenisch et al., 2004; Späni et al., 2005). Daher ist es äusserst wichtig Chlamydien in ungeklärten Abortfällen oder nach Ausschluss der anderen gängigen Aborterreger in Betracht zu ziehen. Zudem könnten Vertreter der neu beschriebenen Familie *Waddliaceae* der Ordnung der *Chlamydiales* als Aborterreger und Verursacher anderer Pathologien von Wichtigkeit sein, wie dies bereits in zwei Fällen von Rinderabort beschrieben wurde, bei denen *Waddlia chondrophila* isoliert werden konnte (Dilbeck et al., 1990; Everett et al., 1999; Rurangirwa et al., 1999; Horn et al., 2000; Henning et al., 2002).

Bei Schweinen kann neben *Chlamydophila abortus* auch *Chlamydia suis* und *Chlamydophila pecorum* an verschiedenen Krankheitsbildern beteiligt sein (Endometritis, Mastitis, Enteritis, Pneumonie und Konjunktivitis) (Rogers et al., 1993; Rogers and Andersen, 1996; Szeredi et al., 1996; Thoma et al., 1997b; Busch et al., 2000; Camenisch et al., 2004; Longbottom, 2004).

Beim Wiederkäuer ist *Chlamydophila pecorum* verantwortlich für Arthritis, Pneumonie, Mastitis, Konjunktivitis oder subklinische intestinale Infektionen (Storz, 1988; Fukushi and Hirai, 1992, 1993; Storz and Kaltenböck, 1993). Ebenfalls konnten Chlamydien (*Chlamydophila abortus* und *Chlamydophila psittaci*) in Ejakulaten von Schweinen und Wiederkäuern gefunden werden, was bei der venerischen Übertragung des Erregers eine Rolle spielen könnte (Storz et al., 1968, 1976; Wilsmore et al., 1984; Amin and Wilsmore, 1995; Papp and Shewen, 1996; Teankum et al., 2004; Teankum et al., 2005).

Die Psittakose (*Chlamydophila psittaci*) bei verschiedenen Vogelarten kommt weltweit vor und ist eine meldepflichtige Tierseuche (Meyer, 1965, 1967; Grimes and Wyrick, 1991; Vanrompay et al., 1995).

Bei Katzen ist es die Spezies *Chlamydophila felis*, welche Konjunktivitiden auslösen kann und deshalb auch massgeblich am Katzenschnupfenkomplex beteiligt ist (Baker, 1942; Schachter et al., 1969; Johnson, 1983; Bart et al., 2000; Hartley et al., 2001; Sykes, 2001; Longbottom and Coulter, 2003; von Bomhard et al., 2003).

In granulomatösen Veränderungen der inneren Organe von Reptilien konnte wiederholt *Chlamydophila pneumoniae* nachgewiesen werden und auch bei Amphibien wurde diese Chlamydienspezies beschrieben (Berger et al., 1999; Bodetti et al., 2002; Jacobson et al., 2004; Soldati et al., 2004).

In einem Meerschweinchenbestand mit Abortfällen und Konjunktivitis konnte sowohl in Augentupfern von Meerschweinchen als auch vom Besitzer selber *Chlamydophila caviae* nachgewiesen werden (Becker et al., 2004).

Beim Pferd wird in der Literatur über ein Vorkommen von *Chlamydophila abortus* und *Chlamydophila pneumoniae* berichtet, was bis anhin jedoch noch nicht in der Schweiz bestätigt werden konnte (Wills et al., 1990; Storey et al., 1993; Forster et al., 1997; Henning et al., 2000).

Einige der genannten Spezies sind auf den Menschen übertragbar (*Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila psittaci*) und können Aborte bei der schwangeren Frau oder schwere Pneumonien auslösen (Buxton, 1986; Oldach et al., 1993; Vanrompay et al., 1995; Jorgensen, 1997; Rodolakis et al., 1998; Everett et al., 1999; Aitken, 2000; Pospischil et al., 2002a; Longbottom and Coulter, 2003). Bei den anderen genannten Vertretern ist ein Zoonosepotential vorhanden, jedoch noch nicht bewiesen (Longbottom and Coulter, 2003). Tabelle 1 zeigt dies übersichtlich.

Chlamydienspezies	Zoonosepotential
<i>Chlamydia trachomatis</i>	?
<i>Chlamydia suis</i>	?
<i>Chlamydia muridarum</i>	?
<i>Chlamydophila psittaci</i>	+++
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	++
<i>Chlamydophila felis</i>	++
<i>Chlamydophila abortus</i>	+++
<i>Chlamydophila caviae</i>	++
<i>Chlamydophila pecorum</i>	?
<i>Waddlia chondrophila</i>	?
<i>Simkania negevensis</i>	?

Tabelle a: Zoonosepotential der verschiedenen Chlamydienspezies

Die nachfolgende Tabelle zeigt noch einmal die verschiedenen Spezies aus der Familie der *Chlamydiaceae* und die Krankheiten, die sie bei Tier und Mensch hervorrufen können.

Spezies	hauptsächlicher Wirt/Relevanz	Symptomatik
<i>Cp. psittaci</i>	Vögel, Mensch und zahlreiche andere Säugetiere	Psittakose (Ornithose)-Komplex; Pneumonien
<i>Cp. abortus</i>	Schaf, Ziege, Mensch	Abort, Infertilität
<i>Cp. pneumoniae</i>	Mensch, Reptilien, Amphibien	Pneumonie, ZNS-Erkrankungen (Morbus Alzheimer), Herz-Kreislauf-Erkrankungen, granulomatöse Entzündungen
<i>Cp. pecorum</i>	Rind, Schaf	Pneumonie, Polyarthritits, Enzephalomyelitis und Diarrhoen
<i>Cp. felis</i>	Katze	Konjunktivitis, Katzenschnupfenkomplex
<i>Cp. caviae</i>	Meerschweinchen	Konjunktivitis, Abort
<i>C. trachomatis</i>	Mensch	Keratokonjunktivitis (Trachom) Urogenitalinfektionen (LGV)
<i>C. suis</i>	Schwein	Endometritis, Mastitis usw.

Tabelle b: Bedeutung der verschiedenen Chlamydienpezies bei Mensch und Tier

3. Diagnostische Methoden

Eine genaue und schnelle Diagnose der Chlamydienpezies ist also nicht nur für die betroffene Tierart oder den Bestand von grösster Wichtigkeit, sondern auch zum Schutze des Menschen vor einer allfälligen zoonotischen Infektion.

Üblicherweise erfolgt der direkte Erregernachweis mittels folgender Methoden (Stamp et al., 1950; Butty-Favre and Nicolet, 1987; Rodolakis, 1988; Aitken, 2000; Creelan and McCullough, 2000; Aitken, 2004):

1. Anzüchtung und Isolation in Zellkultur oder Hühnerei
2. speziell gefärbte Ausstriche (Stamp, Macchiavello, modifizierte Ziehl-Neelsen)
3. Antigen-ELISA
4. Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz (IF)
5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Einige dieser Methoden setzen eine hohe Erregerdichte im Ausgangsmaterial voraus und sind deshalb nicht sehr sensitiv (z.B. Ausstrichdiagnose) (Butty-Favre and Nicolet, 1987; Rodolakis et al., 1998). Andere Methoden wiederum sind für die Routinediagnostik zu aufwendig und zu teuer und brauchen ein speziell eingerichtetes Labor (z.B. Anzüchtung) (Rodolakis et al., 1998; Wang, 1971). Bereits formalinfixierte Proben können nicht mehr mit der Ausstrichmethode oder der Anzüchtung untersucht werden.

Die Verwendung der Immunhistologie ermöglicht wohl den Nachweis des Erregers in den Läsionen, oft werden aber Antikörper, welche mit allen Vertretern der Familie der *Chlamydiaceae* reagieren verwendet. Somit erlauben sie keine speziesspezifische Diagnose.

Bei der sensitiven PCR-Methode gilt zu bedenken, dass eine positive Bande in der Agarosegelelektrophorese nur das Vorhandensein eines Amplifikates beweist, jedoch noch keine gezielte Speziesdiagnose ermöglicht.

Eine grosse Rolle spielt zudem das Probenausgangsmaterial: Bei Feldmaterial kommt es häufig vor, dass das eingesandte Material bereits eine gewisse Autolyse aufweist, was wiederum bei der Wahl der Untersuchungsmethode beachtet werden muss. Frische Proben (z.B. Tupfer) müssen mit anderen Methoden untersucht werden als bereits formalinfixierte Gewebe. Formalinfixierte und autolytische Gewebe weisen zudem oft Strangbrüche in ihrer DNA auf, was bei der PCR-Untersuchung berücksichtigt werden muss (die Wahl des zu amplifizierenden Produktes muss möglichst unter 300 bp sein). Die Sensitivität und Spezifität der verschiedenen diagnostischen Methoden die zum heutigen Zeitpunkt zur Anwendung kommen kann erheblich schwanken, wie dies die nachfolgende Tabelle zeigt:

Methoden	Sensitivität	Spezifität
Zellkultur	50-95 %	100 %
PCR-Techniken	ca. 95 %	ca. 99 %
Antigen-ELISA-Techniken	70-80 %	70-95 %
Gen-Sonden	70-80 %	90-95 %

Tabelle c: Sensitivität und Spezifität verschiedener diagnostischer Methoden

Die in der Tabelle aufgeführten Werte sind Durchschnittswerte aus unzähligen hier nicht aufgeführten Studien und dienen zum Überblick.

Da die Symptomatik der Chlamydiosen nicht einheitlich und pathognostisch ist, und das symptomlose Trägertum in der Verbreitung der Chlamydien eine grosse Rolle spielt, scheint die Labordiagnostik der wichtigste Punkt bei der Ätiologie solcher Erkrankungen zu sein.

Es gibt eine Vielzahl von Labormethoden die alle entweder auf dem Prinzip des **direkten** Erregernachweises (Anzüchtung, Anfärbung, Antigen-ELISA-Testsysteme oder Nukleotidamplifikation wie PCR, DNA-Chip-Technologie usw.) oder **indirektem** Nachweis (verschiedene Antikörper-Nachweissysteme) basieren.

Im folgenden Abschnitt wird nur der direkte Antigen- bzw. DNA-Nachweis besprochen.

3.1. Anzüchtung

In der Regel werden Zellkulturen (McCoy usw.) beimpft. Alternativ kann auch mit embryonierten Hühnereiern getestet werden, jedoch hat sich heutzutage abhängig von der Chlamydienart die Zellkultur mit verschiedenen Zelllinien durchgesetzt (Pearson et al., 1989).

Die Methode der Anzüchtung gilt in der Veterinärmedizin heute noch als Goldstandard, obwohl diese sehr zeit- und arbeitsintensiv ist. Das Ergebnis liegt erst nach 48-72 h vor. Die Sensitivität liegt im Bereich von 50-95% je nach Qualität des Probenmaterials, die Spezifität allerdings ist mit 100% praktisch unübertroffen.

3.2. Ausstrich

Färbungen für Ausstriche, Abklatschproben oder Proben nach erfolgter Anzüchtung in der Zellkultur sind unter anderen Giemsa (1904), Stamp (1950), Giménez (1964) und Macchiavello (1937). Der Vorteil dieser Methode liegt im geringen Zeitaufwand. Die Einschlusskörperchen können auch mit fluoreszierenden, monoklonalen Antikörpern (Immunseren) nachgewiesen und mikroskopisch beurteilt werden. Hierbei wird häufig das „major outer membrane protein“ (MOMP) nachgewiesen.

Die Sensitivität und Spezifität solcher Methoden hängt hauptsächlich vom Untersucher am Mikroskop ab, kann aber bis zu 100% betragen. Ein zellreiches Probenmaterial ist aber immer Voraussetzung. Allerdings müssen die Chlamydien nicht, wie bei der Zellkultur unbedingt notwendig, noch lebensfähig, jedoch in grosser Zahl vorhanden sein. Dies ist wiederum ein Nachteil und verringert die Sensitivität dieser Nachweismethode. Die Erregerdichte muss bei der Anfärbung ca. 3×10^6 Chlamydien/ml sein (Wittenbrink et al., 1987). Bei der Immunfluoreszenz liegt die Sensitivität deutlich höher (Sachse und Hotzel, 2002).

3.3. Antigennachweis (ELISA)

Kommerzielle Antigen-ELISA-Kits weisen das Lipopolysaccharid (LPS)-Antigen bei Chlamydien nach. Sie können die Spezies *Chlamydia* und *Chlamydophila* nachweisen, sind also nur genuspezifisch. Mit LPS-Epitopen anderer gram-negativer Bakterien kann es zu Kreuzreaktionen kommen (Bogner et al., 1997) was die Spezifität verschlechtert (Grimes, 1989).

Vorteil dieser Methode ist die einfache Durchführung und durch Automatisierung der Untersuchung ist auch ein schnelles Resultat bei grösseren Probenanzahlen möglich.

3.4. Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz (IF)

An Gewebeschnitten wird der Erreger direkt mit Antikörpern (Kaninchen, polyklonal; Maus, monoklonal) inkubiert und unter dem Mikroskop beurteilt. Die Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) Methode oder Avidin-Biotin-Komplex-Methode sind bekannt (Moore und Petrak, 1985; Lundemose et al., 1989; Theil et al., 1996; Guscetti et al., 1998b). Antikörper richten sich meistens gegen das LPS Antigen und erkennen *Chlamydiaceae*.

Die IHC dient in der vorliegenden Studie zusammen mit anderen Methoden als Referenzdiagnostik.

Für die Immunfluoreszenz-Methode wird unfixiertes Material benötigt. Zum Beispiel werden Ausstriche oder Gefrierschnitte von Geweben oder Zellkulturen genommen (Schachter, 1991; Caudill et al., 1994). Für die direkte Immunfluoreszenz werden FITC-markierte monoklonale Antikörper gegen äussere Membranproteine verwendet. Die Sensitivität liegt im Vergleich zur Zellkultur zwischen 60-90% (50-95% bei der Zellkultur).

3.5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR gehört zu den gentechnischen Nachweismethoden.

Nukleinsäureamplifikationsmethoden wie beispielsweise die PCR oder LCR (Ligase-Ketten-Reaktion) sind in ihrer Sensitivität mit keiner anderen Methode zu übertreffen. Theoretisch genügt ein einziges Stück DNA in der Probe zum Nachweis.

DNA-Amplifikations-Techniken sind bezüglich Sensitivität der neue Goldstandard und weisen eine mindestens 10% höhere Sensitivität als die Zellkultur auf (Schachter et al., 1994). Meist liegt die Sensitivität und Spezifität über 90% (Ostergaard et al., 1991; Viscidi et al., 1993; Vogels et al., 1993).

Pollard et al. beschrieben die PCR als Nachweismethode für Chlamydien erstmals im Jahre 1989. Heute wird vor allem die nested-PCR für die omp1-Genregion (outer-membrane-protein 1) in der Routinediagnostik verwendet (Kaltenböck et al., 1997).

Eine PCR die weniger sensitiv ist, dafür aber eine genaue Unterscheidung von kultivierten Stämmen erlaubt, amplifiziert einen Bereich zwischen dem 16Sd und 23S rRNA-Gen. Durch nachfolgende Charakterisierung mit Hilfe des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (PCR-RFLP) können die verschiedenen Spezies genau differenziert werden. (Everett et al., 1999).

Schlussendlich ist eine quantitative Analyse mit der Real-time PCR möglich.

Die LCR (Ligase-Ketten-Reaktion) ist eine spezielle Amplifikationsmethode, die im Jahre 1991 von Barany beschrieben und später von Laffler et al. durchgeführt wurde (1993).

Bezüglich Sensitivität und Spezifität ist die LCR der PCR ähnlich (Schachter et al., 1994).

Dem in dieser Studie vorgestellten ArrayTube-System ist eine PCR (23S rRNA-Gen) vorgeschaltet.

4. Chip-Technologie

4.1. Allgemeines über Chip-Technologien

Im Jahre 1975 entwickelte E. M. Southern die technische Grundlage für DNA-Mikroarrays mit der Methode des so genannten Southern Blots. Mit seiner Technik wurde es möglich DNA-Fragmente zu identifizieren (Southern, 1975). Durch Weiterentwicklung dieses Prinzips der Hybridisierung entstand der Makroarray.

Hybridisierung ist der Vorgang einer nicht kovalenten Bindung antiparalleler Nukleinsäure-Einzelstränge durch die Verknüpfung ihrer heterozyklischen Basen mittels

Wasserstoffbrücken. Diese Basenpaarungen sind hochspezifisch (Watson und Crick, 1953).

Nukleinsäuren wurden auf Oberflächen, wie z.B. Glas kovalent gebunden und so fixiert. Dies setzt eine gewisse Anzahl amplifizierter DNA-Fragmente voraus.

Mit der Erfindung der PCR anfangs der 80er Jahre wurde es möglich, auch kleinste Mengen von Nukleinsäure soweit zu vervielfältigen, dass sie auf einen Chip hybridisiert und dadurch sichtbar gemacht werden konnten (Lander, 1999).

Man unterscheidet zwischen Makro- und Mikroarrays. Makroarrays sind grösser, arbeiten mit radioaktiv markierter cDNA und sind kostengünstiger als Mikroarrays. Ein Makroarray trägt weniger als 500 Spots/cm² („Features“/cm²). Ein Mikroarray aber besitzt mehr als 500 Spots/cm² (Affymetrix GeneChip Patent).

Die Mikroarray-Technologie wird seit den 90er Jahren laufend weiterentwickelt (Marshall und Hodgson, 1998).

Die untenstehende Tabelle zeigt wie die verschiedenen Mikroarrays unterteilt werden können:

Art der Sonden	Nukleinsäuren (Oligonukleotide) Proteine oder Peptide Zellen Polysaccharide
Substrat (Chipmaterial)	Glas synthetische Materialien Membranen (Nylon oder Nitrocellulose)
Herstellung des Arrays	gespottet (low-density) synthetisiert (high-density)

Tabelle d: Unterteilung der verschiedenen Chip-Formen

Eine Unterscheidung der Mikroarrays kann einerseits durch die Art der immobilisierten Sonden (Biomoleküle) vorgenommen werden. Als Sonden kommen daher DNA-Moleküle (Oligonukleotide, wie in der vorliegenden Arbeit angewendet oder cDNA, welche nur mit Hilfe einer reversen Transkriptase hergestellt werden kann), Proteine oder Peptide als auch ganze Zellen (Tissue-array) in Frage.

Weitere Unterscheidungsmerkmale sind die Art der Materialien des Substrates (Chipmaterial). Diese kann aus verschiedensten Materialien bestehen (Marshall und Hodgson, 1998). Beim ArrayTube(AT)-System ist der Chip aus Glas gefertigt. Die Vorzüge von Glas sind, dass die Sonden auch kovalent auf die Oberfläche angebracht werden können. Glas ist ausserdem sehr hitzebeständig und „hoch-ionischen“ Waschlösungen gegenüber beständig (Cheung et al., 1999). Da es nicht porös ist wird das Volumen der Hybridisation auf ein Minimum beschränkt. Noch einen Pluspunkt erhält Glas, weil es wenig fluoresziert, was bei der Detektion mit Fluoreszenz ein Vorteil bringt (weniger „background noise“) (Cheung et al., 1999).

Als letztes wichtiges Kriterium erachtet man die Art der Herstellung des Mikroarrays. Hier unterscheidet man „high-density“ und „low-density“ Verfahren.

Bei den „high-density“ DNA-Chips werden die Oligonukleotide direkt auf dem Träger chemisch synthetisiert (Affymetrix). Beispiele sind die fotolithografische Synthese oder das „Micro Wet Printing“ (strukturierte Membranen mit Fenstern). Die fotolithografische Synthese funktioniert so, dass ein synthetischer Linker, der mit einer fotosensitiven Schutzgruppe gekoppelt ist, auf einem Glaträger verankert wird. Belichtete Stellen setzen dann ihre reaktive Gruppe frei. Die freien Stellen sind nun befähigt Nukleotide kovalent zu binden. Synthetisiert werden kurze Oligonukleotid-Sonden von 25 Basenpaaren oder weniger (Affymetrix). So hergestellte Mikroarrays besitzen eine hohe Dichte der Sonden (high-density-Oligonukleotid-Mikroarrays).

Erstmals berichtete Lockhart et al. 1996 über diese Oligonukleotid-Array-Technik. Ihre Sonden wurden nicht mittels PCR hergestellt und dann auf die Oberfläche getropft („gespottet“), sondern direkt auf dem Chip („in-situ“) synthetisiert. Die Länge dieser Sequenzen war nur 20 bp, was zum Ausdruck „Oligonucleotid-Array“ beiträgt. Die Oligonukleotide bei der „high-density“-Methode sind kovalent an die Festkörperoberfläche gebunden.

Bei der „low-density“ Chip-Technologie werden die DNA-Sonden durch PCR hergestellt und anschliessend auf den Chip gespottet. Dieses Verfahren ist schon älter als das „high-density“ und wurde von Schena et al. 1995 beschrieben. Mit Hilfe der Tintenstrahltechnologie wurden die Sequenzen auf den Glas-Chip aufgebracht. Über Ankermoleküle wurden diese immobilisiert. Kontaktdruckverfahren, wie „Contact Tip Printing“, „Micro Contact Printing“ oder Elektrochemische Fokussierung, als auch Verfahren ohne Kontakt, wie „Piezoelektrisches Spotten“ (Ink-Jet) oder „Bubblejet Printing“ sind bekannt (Günther, 2004).

Der in dieser Studie verwendete ArrayTube ist ein DNA-Chip aus Glas mit gespotteten Sonden. Der Chip ist am Boden eines 1,5 ml Reaktionsgefässes (Tube) eingelassen.

Sowohl die aufgespotteten Sequenzen als auch die in-situ-synthetisierten Oligonukleotide müssen zur Sichtbarmachung und Auswertung markiert sein. Es gibt verschiedene Markierungsmethoden:

Markierung	Methode	Detektion
Fluoreszenz	Einbau von markierten Nukleotiden (Cy-3, Cy-5 usw.), z.B. bei der PCR	Fluoreszenz-Mikroskope, Konfokale-Laserscanner, CCD (charge-coupled device)-basierte Detektionssysteme
Radioaktivität (Whitney und Becker, 2001)	Einbau von markierten Nukleotiden (^{32}P , ^{33}P , ^{35}S)	Röntgenfilme, Autoradiografie-Imaging-Systeme
Chemilumineszenz (Cheek et al., 2001)	Markierung durch chemilumineszente Moleküle oder Enzyme	Lumineszenzreader
Gold/Silber (Cao et al., 2002)	Gold-Partikel (z.B. über Biotin/Streptavidin-Gold)	Durchlichtmessungen mit hochauflösender CCD-Kamera

(Modifiziert nach Günther, 2004)

Tabelle e: Markierungsverfahren von Substratmolekülen

DNA-Mikroarrays wurden bereits erfolgreich zur Identifikation und Typisierung von pathogenen Bakterien wie Mykobakterien (Troesch et al., 1999), Staphylokokken (Monecke et al., 2003 und 2005), *Escherichia coli* O157:H7 (Call et al., 2001; Chizhikov et al., 2001), *Listeria* spp. (Borucki et al., 2003) und weiteren eingesetzt (Al-Khaldi et al., 2004; Anthony et al., 2000; Kim et al., 2004; Perreten et al., 2005; Roth et al., 2004; Sachse et al., 2005; Wilson et al., 2002). Auch Viren wurden untersucht (Conejero-Goldberg et al., 2005). Die Methode basiert auf der strikten Nukleotidsequenz-basierten Identifikation von Mikroorganismen.

4.2. ArrayTube-System (Clondiag)

Die ArrayTubes wurden von der Firma Clondiag in Jena (Deutschland) bezogen. Das ArrayTube (AT) ist ein Reaktionsgefäß (Tube), auf dessen Boden sich ein Chip befindet. Dieser Chip ist ein DNA-Mikroarray mit gespotteten Sonden auf Glas und misst 3,4 x 3,4 mm.



DNA-Mikroarray (Chip)

Abbildung 3 : ArrayTube mit DNA-Chip am Boden des Reaktionsgefäßes

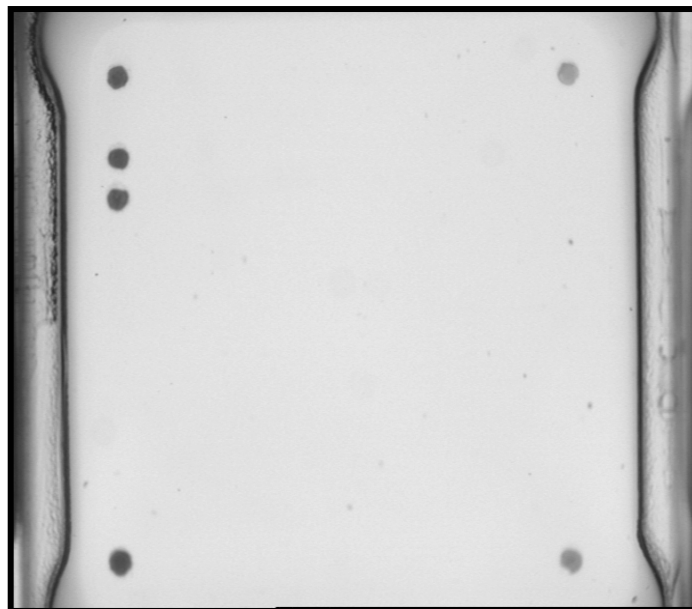


Abbildung 4: Bild des Mikrochip nach Hybridisierung einer Chlamydien-negativen Probe oder der Negativkontrolle, nur die Fixpunkte sind sichtbar. Auswertung auf dem AT-Reader®.

Die Spottung der Nukleotide ist folgendermassen aufgebaut: 13 x14 Spots (182 total, wovon 6 Spots die Fixpunkte darstellen, wie oben auf dem Bild gezeigt) und jede Sonde ist in 5-facher Redundanz vorhanden. Es können folgende Chlamydien-Spezies auf dem Chip differenziert werden:

Chlamydia trachomatis
Chlamydia suis
Chlamydia muridarum
Chlamydophila psittaci
Chlamydophila pneumoniae
Chlamydophila felis
Chlamydophila abortus
Chlamydophila caviae
Chlamydophila pecorum
Waddlia chondrophila
Simkania negevensis

Somit sind alle bis heute bekannten, klinisch relevanten Chlamydien-Spezies auf dem Mikrochip vertreten.

Bei allen Ansätzen wird als erster Schritt die allenfalls vorhandene Chlamydien-DNA extrahiert. Anschliessend wird eine PCR durchgeführt. Bei der nachfolgend beschriebenen PCR wird ein ca. 170 bp langes DNA-Fragment aus der Region des 23S rRNA-Gens bei allen genannten Chlamydienspezies amplifiziert.

Mittels eines am 5'-Ende mit Biotin gekoppelten Primers werden diese Fragmente markiert. Bei der nachfolgenden Hybridisierung auf dem ArrayTube Mikroarray binden diese spezifisch an den Stellen auf dem DNA-Chip, welche mit den ihnen komplementären DNA-Sonden gespottet sind.

Die Spots werden durch eine enzymatische kolorimetrische Methode sichtbar gemacht, auf den PC-Bildschirm übertragen und durch den AT-Reader bewertet. Die Messung mit dem AT-Reader dauert nur 10 min, die Vorbereitung der Proben im ArrayTube 2-3 h.

Die Biotinylierung des reverse Primers am 5'Ende ermöglicht die Einführung eines Biotinmoleküls in die PCR-gefertigten DNA-Fragmente, welche für die spätere Detektion der Hybridisationsmuster über eine Streptavidin/HRP-Konjugation nötig ist.

Die beschriebenen Primer flankieren einen Bereich des 23S rRNA-Gens bei Chlamydien welches sich bei den verschiedenen Chlamydien-Spezies am meisten unterscheidet („most-variable-window“, MVW) und am Anfang des 23S rRNA-Gens liegt. Dies ist auf der nachfolgenden Abbildung verdeutlicht:

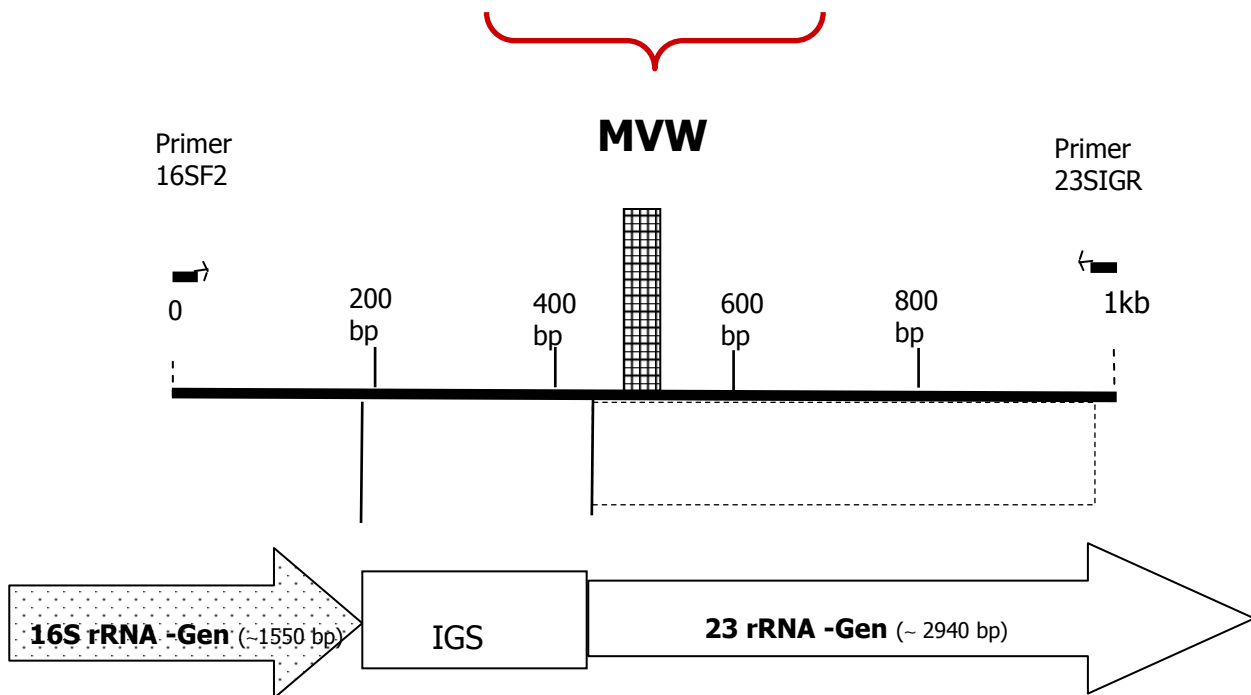
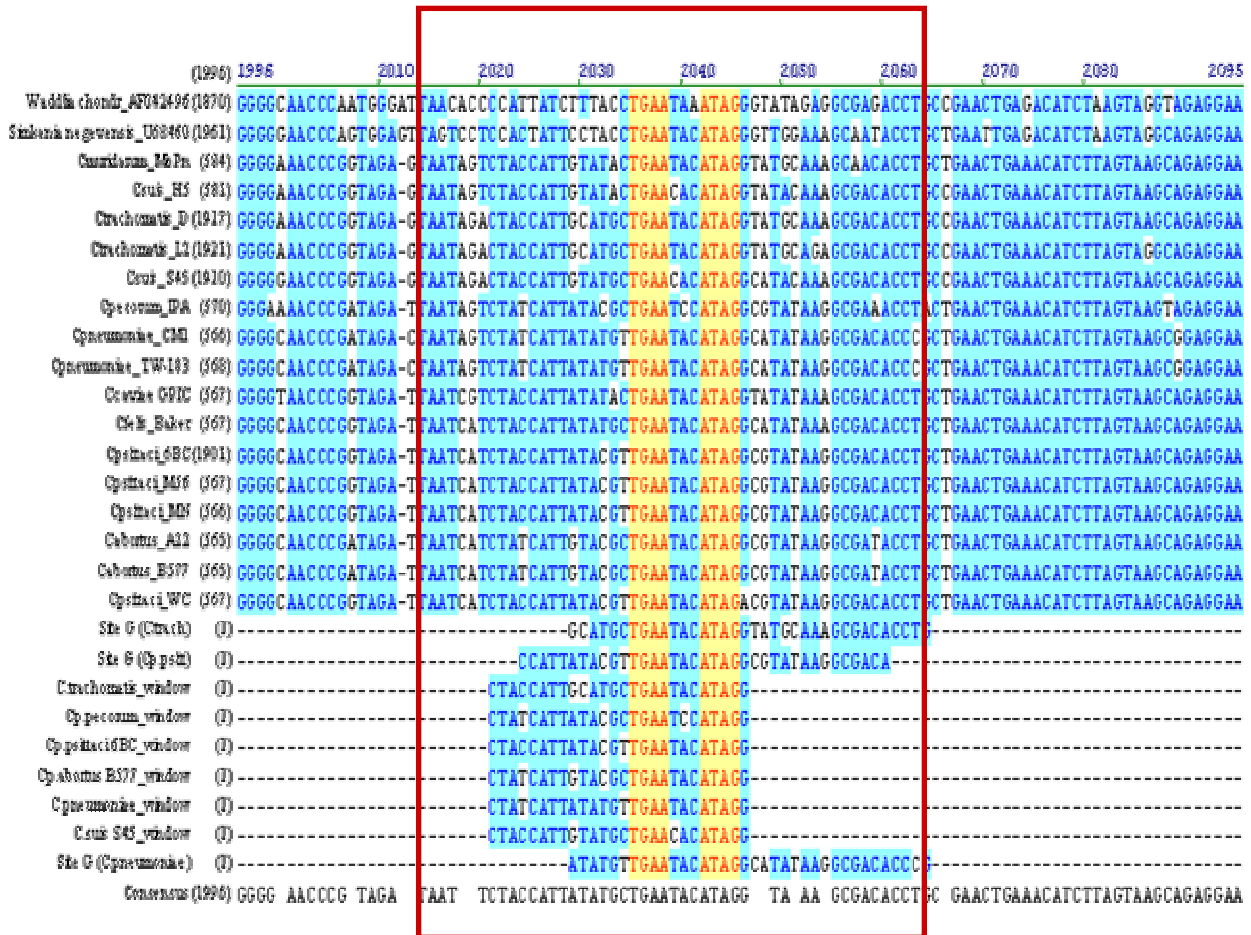


Abbildung 5: Lage des MVW („most variable window“)

Die Detektion der spezifischen Hybridisierungsmuster erfolgte über eine Streptavidin/HRP-Reaktion und die Auswertung auf dem ATR-01-Reader (Clondia). Die Schritte der Hybridisierung sind in der nachfolgenden Abbildung detailliert dargestellt:

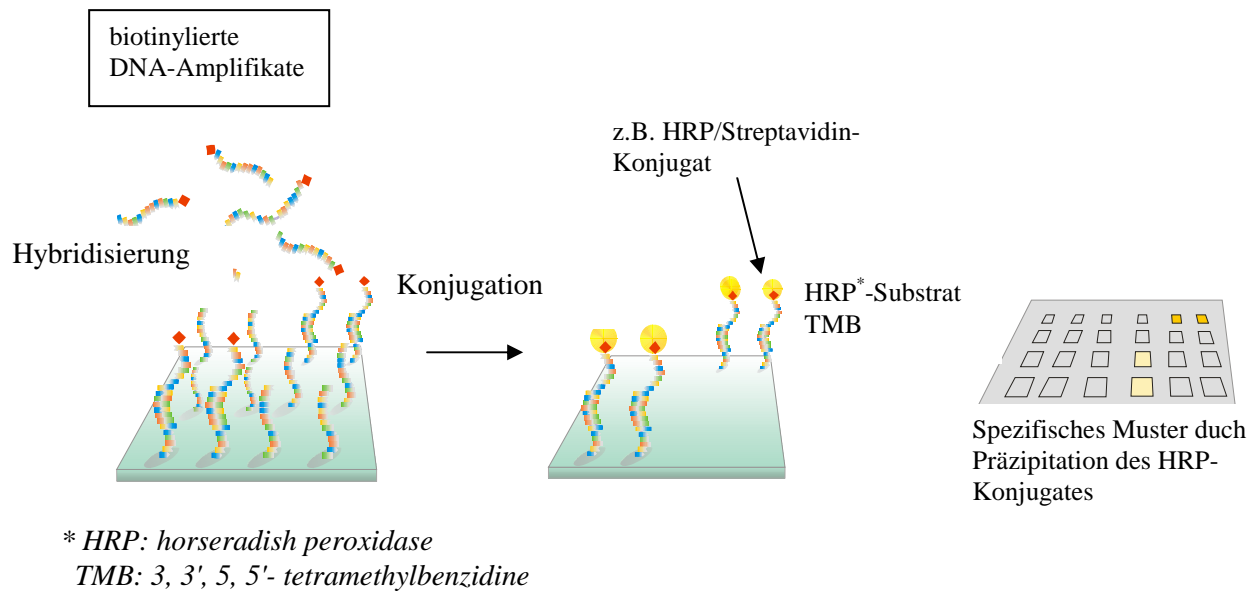


Abbildung 6: Schritte der Hybridisierung

Mittels des am Ende zugegebenen Substrates kommt es zu einer Farbreaktion. Die Detektion der sich bildenden dunkelgrauen Spots erfolgt dann durch eine Transmissionsmessung im AT-Reader mit anschließender Auswertung der erhaltenen Daten durch die IconoClust-AT-Software (Clondia, Jena).

Ziel des vorliegenden Projektes ist es im Rahmen der Tätigkeit als nationales Referenzlabor für Chlamydienabort bei Schaf und Ziege eine neue diagnostische Methode zu validieren, welche eine schnelle und zuverlässige Detektion und Speziesidentifikation von *Chlamydia* und *Chlamydophila* in verschiedenen Probenmaterialien vom Tier ermöglicht.

IV Eigene Untersuchungen

1. verwendete Kits, Chemikalien und Lösungen

Ethanol 80%

Xylol

Proteinase K

Agarosegel 1,5% mit Ethidiumbromid in TAE-Puffer

Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, USA)

MinElute PCR Purification Kit (Qiagen 28004) für DNA-Elution aus Gel, zur Sequenzierung einer Bande

Waschlösung:

SSC (NaCl+tri-Natriumcitrat-Dihydrat, MG: 294.1)

Konditionierungspuffer:

3DNA/SDS-Puffer

Für 100 ml: 25ml 1M NaPO₄ , pH=7,2; 22,5 ml 20% SDS (Natrium-dodecyl-Sulfat);

200 µl EDTA (0,5 M), pH=8; 5 ml 20x SSC; Aqua bidest

Lösungspuffer:

Stocklösung:

10x SSPE

pH=7,2.

Für 200 ml: 17,53 g NaCl (1,5 M); 2,76 g Na₂HPO₄ MG:142; 0,74 g EDTA (0,01 M); Aqua bidest; pH=7,4 für fertige Lösung

Gebrauchslösung:

6x SSPE/0,005 % Triton

Für 200 ml: 120ml 10x SSPE; 80 ml Aqua bidest; 10 µl Triton X-100

Blockierlösung:

2% Milchpulver (Oxoid L31, Skim Milk Powder) in 6x SSPE/0,005 Triton X-100

Konjugationslösung:

Poly-HRP Streptavidin (Pierce, Rockford, USA, N200)

1:10'000 verdünnt in 6x SSPE/0,005 Triton

Entwicklungslösung:

KPL Peroxidase Substrat TrueBlue (Pierce, Rockford, USA, S4-78-00)

Reagenzien für die PCR:

PCR-Puffer 10X (Applied Biosystems, Rotkreuz, Schweiz)
MgCl₂ 50mM (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz)
dNTP 10mM (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz)
Primer 23 F 100 µM (5'-ATT GAM(c/a) AGG CGA W(a/t)GA AGG A-3', Microsynth)
Primer 23 R 100 µM (5'-Biotin-GCY(t/c) TAC TAA GAT GTT TCA GTT C-3', Microsynth)
Polymerase Taq Gold (Applied Biosystems, Rotkreuz, Schweiz)

Geräte und Zubehör:

PCR-Gerät (GeneAmp, PCT System 9700, Applied Biosystems)
pH-Meter
Laminarflow
Zentrifuge
Thermomixer/Schüttler
Vortexer
UV-Box
Fotoraum und Zubehör (Filme)
ArrayTubes® (Clondia, Jena, Deutschland)
AT®-Reader ATR 01 (Clondia, Jena, Deutschland)
Standard-Laborutensilien (Pipetten, Papiertücher usw.)

2. Untersuchungsmaterial

Zur Validierung der ArrayTube-Technologie für die Routinediagnostik wurde formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe und Frischmaterial untersucht. Es wurden unterschiedliche Organe oder Proben von zahlreichen Tierarten mit einbezogen. Zusätzlich wurden einige Experimente zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität durchgeführt. Total handelt es sich um 340 Proben die untersucht wurden (ohne Verdünnungsreihen).

2.1. Formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe (n = 152)**(i) Chlamydien-positive Fälle (n = 57)**

- Plazenta und fetale Organe von Schaf und Ziege (n = 15) (Chanton-Greutmann et al., 2002)
- Plazenta vom Rind (n = 11) (Borel et al., 2006)
- menschliche Plazenta (n = 1) (Pospischil et al., 2002a und 2002b)
- verschiedene Organe von Fröschen (n = 3) (Blumer et al., 2005)
- Schlangen mit granulomatösen Entzündungen (Leber, Lunge) (n = 3) (Soldati et al., 2004)

- Psittakosefälle aus der Abteilung der Geflügelkrankheiten (n = 11)
- Dünndärme von gnotobiotischen Ferkeln die mit verschiedenen Chlamydien spezialisiert infiziert wurden (n = 9) (Guscetti et al., 1998b)
- Organ-Homogenat von natürlich an Chlamydiose erkrankten Ferkeln (n = 4) (Jena, Deutschland)

(ii) Chlamydien-negative Fälle (n = 38)

- Plazenta und fetale Organe von Schaf und Ziege (n = 11) (Chanton-Greutmann et al., 2002)
- Plazenta vom Rind (n = 14) (Borel et al., 2006)
- Salmonellose oder Mykobakteriose (Leber, Lunge) von Reptilien (n = 4)
- Organe von Vögeln (n = 6)
- Dünndärme von gnotobiotischen Ferkeln ohne Infektion (Negativkontrollen der jeweiligen Stämme) (n = 3)

(iii) Zellpellets und Zellkulturen (Mono-, Misch- und Mehrfachinfektionen)
HEp-2-, Vero 76-, CaCo-2-Zellen und Amöben experimentell mit verschiedenen Chlamydien spezialisiert infiziert (**n = 57**)

- Zellpellet ohne experimentelle Infektion (Negativkontrolle) (n = 1)
- Amöbenpellet infiziert mit *Parachlamydia Hall' coccus* (n = 1)
- Zellpellets mit Monoinfektionen (n = 7)
- Zellpellets mit Doppel- und Mehrfachinfektionen (n = 22)
- Zellkulturen die mit Kot von verschiedenen Tierarten beimpft wurden (n = 26)

2.2. Frischmaterial: Tupfer und Milchproben (n = 141)

- Augentupfer von Meerschweinchen (n = 22) (Lutz-Wohlgroth et al., 2006)
- Proben von der Linse und Augentupfer des Besitzers (n = 4) (Lutz-Wohlgroth et al., 2006)
- Proben vom Menschen und Vögeln aus einem Psittakose-Ausbruch in Deutschland (2005) (n = 13)
- Augentupfer vom Schaf (n = 22) (Becker et al., 2006)
- Nasen- und Augentupfer von Kälbern aus einer Herde mit Erkrankungen im Respirationstrakt (Jena) (n = 59)
- Milchproben einer Kuhherde mit Abortproblemen (Jena) (n = 21)

2.3. Bakterienstämme: DNA von verschiedenen anderen Bakterienspezies
aus der Abteilung für Lebensmittelhygiene und aus dem Friedrich-Löffler-
Institut in Jena (**n = 47**)

- *Bacillus cereus* ATCC 13061 (Jena)
- *Bacillus cereus* ATCC 13061 (Zürich)
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Brachyspira innocens* B256
- *Burkholderia cepacia* ATCC 25416
- *Burkholderia fungorum* A157
- *Burkholderia mallei* ATCC 23344
- *Burkholderia pseudomallei* ATCC 23343
- *Campylobacter coli* BS114/05
- *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* BS101/05
- *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* BS100/05
- *Campylobacter hyointestinalis* BS102/05
- *Campylobacter jejuni* ATCC4688
- *Candida* spp. (wild strain)
- *Clostridium carnis* ATCC 25777
- *Clostridium chauvoei* ATCC 10092
- *Clostridium perfringens* 235/90
- *Clostridium perfringens* type B
- *Clostridium septicum* ATCC 12464
- *Coxiella burnetii* SH6
- *Enterobacter cloacae* 5/93
- *Enterobacter sakazakii* ATCC 51329
- *Enterococcus faecium* DSM 2918
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Gallibacterium anatis* Ge160
- *Gallibacterium genomospecies* Ge81
- *Klebsiella pneumoniae* (wild strain)
- *Lactobacillus acidophilus* ATCC 13651
- *Listeria monocytogenes* (wild strain)
- *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- *Mycobacterium avium* subspecies *avium* ATCC 19421
- *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* ATCC 1698
- *Mycobacterium bovis* 99A1119
- *Mycobacterium intracellulare* DSM 43223
- *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC PG1
- *Pasteurella multocida* 383
- *Proteus mirabilis* DSM 788
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Pseudomonas putida* ATCC 12633
- *Salmonella* Enteritidis (wild strain)
- *Salmonella* Saintpaul 228/93
- *Shigella sonnei* ATCC 29930
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus aureus* St 67
- *Streptococcus agalactiae* ATCC 33019
- *Streptococcus agalactiae* E 12463
- *Yersinia enterocolitica* O:3

2.4. Verdünnungsreihen von Chlamydien-DNA in Wasser und Ejakulaten

Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 1-1000 Chlamydienpartikeln (t) in Wasser (mit und ohne DNA-Extraktion), Eberejakulaten (Azoospermie und Normospermie) und einem Stierejakulat (Normospermie) hergestellt (Teankum et al., 2006). Die Sensitivitäten der verschiedenen PCR Methoden (IGS-L, IGS-S, 16S und AT) wurde untersucht. Es wurde bei allen Versuchen eine Positivkontrolle (*Cp. abortus* in Wasser, 1000t/μl) und eine Negativkontrolle (nur Premix, ohne Template) mitgeführt.

3. Methoden

3.1. Entparaffinierung und DNA-Extraktion

Für die Entparaffinierung von formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Material wurden Paraffinschnitte (ca. 30 μm oder 20-30 μg Gewebe) in 2 ml sterile Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel gegeben.

1000 μl Xylol wurde zugegeben und dann gemischt. Danach wurde bei voller Geschwindigkeit für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgegossen oder mit einer Pipette vorsichtig entfernt. 1000 μl Ethanol wurden zugegeben und dann gevortext. Danach wurde nochmals zentrifugiert wie oben beschrieben. Der Überstand wurde nochmals entfernt. Alle Vorgänge wurden wiederholt. Dann wurden die geöffneten Reaktionsgefäße in den Thermomixer (37-42 °C) gestellt bis alles Ethanol verdampft war. Die Isolierung der DNA wurde mit dem Dneasy Tissue Kit® (Qiagen, USA) durchgeführt. Vorbereitete Proben in Reaktionsgefäßen wurden mit 180 μl ATL-Puffer (Dneasy Tissue Kit) und 20 μl Proteinase K (Dneasy Tissue Kit) über Nacht inkubiert. Dann wurde 15 sek gevortext und 200 μl AL-Puffer (Dneasy Tissue Kit) zugegeben, gemischt und im Thermomixer inkubiert (70 °C, 10 min). Nach der Inkubationszeit wurde 200 μl Ethanol zugegeben und erneut gemischt. In den mitgelieferten Zentrifugensäulen des Dneasy Tissue Kit wurde die Probe für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die abzentrifugierte Lösung wurde verworfen und die Säulen mit der innen an der Membran haftenden DNA weiterverwendet. Die Säulen wurden ein weiteres Mal beladen mit 500 μl AW1-Puffer (Dneasy Tissue Kit), nachdem sie auf ein frisches Gefäß gestellt wurden wie oben zentrifugiert und der Durchfluss wiederum verworfen. Auf einem frischen Gefäß wurde die Säule mit 500 μl AW2-Puffer (Dneasy Tissue Kit) gefüllt und 3 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Zur Eluierung der gewaschenen DNA wurde die Säule noch einmal auf ein frisches Gefäß gestellt und mit 100 μl AE-Puffer (Dneasy Tissue Kit) inkubiert (1 min bei RT). Die anschließende Zentrifugation (1 min bei 8000 rpm) löste die DNA im AE-Puffer von der Membran in der Säule. Im Gefäß wurde sie als Durchfluss aufgefangen. Die Probe wurde danach tiefgefroren (-20 °C) oder direkt weiterverarbeitet.

Die Präparation von bakterieller DNA aus Tupfern und Bronchoalveolarlavage wurde beschrieben (Sachse und Hotzel, 2002). Nasen- und Augentupfer wurden in 500 μl Lysis Puffer (100 mM Tris-Base, pH = 8,5; 0,05 % (v/v) Tween 20) eingetaucht und dann in ein 2 ml SafeLock Röhrchen (Eppendorf, Köln, Deutschland) gegeben und für 1 min gevortext. Nachdem die ganze Flüssigkeit aus dem Tupfer zentrifugiert war (12,000 g, 1 min) wurde das Lysispufferextrakt zentrifugiert (12,000 g, 15 min). Das Pellet wurde in 50 μl Lysispuffer

suspendiert und bei 60 °C für 2 h inkubiert, nachdem noch 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) dazugegeben worden waren. Schliesslich wurde die Proteinase K bei 97 °C für 15 min inaktiviert, und der Zelldetritus wurde durch Zentrifugation entfernt (12, 000 g, 5 min). 1 µl des Überstandes wurde als Template bei der Biotinylierungs-PCR benutzt.

Milch und Kotproben wurden mit dem QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

DNA von Zellkulturen und von nicht-chlamydialen Bakterienkulturen wurden mit Hilfe des High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) extrahiert.

3.2. ArrayTube (AT) assay

PCR und Biotinylierung

Die Proben-DNA wurde amplifiziert und für den AT-Test mit Biotin markiert. Dies geschah in 40 Zyklen bei 94 °C/ 30 s, 60 °C/30 s, und 72 °C/30 s mit den Primer U23F-19 (5'-ATT GAM AGG CGA WGA AGG A-3') und 23R-22 (5'-Biotin-GCY TAC TAA GAT GTT TCA GTT C-3').

Jeder Reaktionsmix (20 µl) enthielt 0,2 µl DNA-Template, 0,2 µl (1 U) Taq Gold DNA Polymerase, 2 µl 10X Taq Puffer, 1 µl MgCl₂ (50 mM), 0,2 µl (10mM) dNTP-Gemisch, 0,1 µl von jedem Primer (100 µM) und 16,2 µl deionisiertes Wasser.

Zur Aktivierung der Primer wurden sie je einmal vor dem ersten Gebrauch im Thermomixer für 10 min bei 60 °C erhitzt. Die gesamte Herstellung des Mastermixes (Premix) wurde an einem anderen Institut durchgeführt. Dies sollte zur Vermeidung von Kontaminationen mit Chlamydien-DNA dienen.

Unter dem Laminarflow wurden die weiteren Zutaten für das PCR-Gemisch zusammengeführt. Es sind dies die Polymerase und das eigentliche Template der PCR, die Probe selbst.

Konditionierung des Tube

Das Tube wurde mit 500 µl Aqua bidest bei 55 °C und 550 rpm 5 min in einem Thermoschüttler (Eppendorf) gespült.

Vorbereitung der Probe

In dieser Zeit wurde die Probe vorbereitet, indem 5 µl des PCR-Produkts (Positivkontrolle nur 1 µl) in einem Eppendorfröhrchen (1,5 ml) mit 95 µl 3DNA/SDS-Puffer (25 ml NaPO₄ (1M), pH=7; 22,5 ml 20% SDS; 200 µl EDTA (0,5M), pH=8; 5 ml 20x SSC und 47 ml Aqua bidest pH = 7,25 für insgesamt 100 ml) gemischt wurden. Im Fall der Positivkontrolle wurde nur 1 µl 3DNA/SDS-Puffer benutzt. Die fertig gemischte Probe ergab 100 µl. Das Gemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Nach dem Spülen mit Aqua bidest wurde das Tube mit 500 µl 3DNA/SDS-Puffer nochmals 5 min bei 550 rpm gespült.

Die vorbereitete Probe wird für 5 min bei 550 rpm und 95 °C denaturiert, dann einige sek zentrifugiert und kurze Zeit auf Eis gelegt.

Hybridisierung der Probe

Der 3DNA/SDS-Puffer wurde aus dem ArrayTube entfernt und mit der Probe (100 µl) bestückt. Dann wurde bei 55 °C für 1 h inkubiert (Hybridisierung).

Konditionierung

Nach 1 h wurde die Flüssigkeit entfernt und 500 µl 2x SSC+0.01% Triton X beigegeben (5 min bei 40 °C und 550 rpm). Dann wurde die Flüssigkeit entfernt und mit 500 µl 2x SSC und 500 µl 0,2x SSC (je 5 min bei 30 °C und 550 rpm) gespült.

Blockierung

Die Flüssigkeit wurde wieder abpipettiert und 100 µl Blockierlösung (2% Milchpulver gelöst in 6x SSPE/0,005% Triton X) hineingegeben und für 15 min inkubiert (30 °C bei 550 rpm). Dadurch wurden die noch freien Stellen auf dem Chip blockiert.

Konjugation

Die Blockierlösung wurde abpipettiert und 100 µl Poly-HRP-Streptavidin 0.1 ng/µl (1: 10'000 verdünnt in 6x SSPE/0,005% Triton X) zugegeben und für 15 min inkubiert (30 °C bei 550 rpm).

Die Konjugationslösung wurde abpipettiert und es wurde wieder 3-mal wie oben beschrieben gewaschen.

Entwicklung, Messung und Auswertung auf dem ATR-01

Die 3. Waschlösung wurde abpipettiert und 100 µl KPL Peroxidase Substrat, ein 3,3',5,5'-tetramethyl-Benzidin-Derivat, zugegeben. Das Tube wurde in den ATR-01 Reader (Clondia Chip Technologies, Jena, Deutschland) eingesetzt. Dieser nahm alle 10 sek ein Bild des Chip auf (insgesamt 60 Bilder). Eine Messung dauerte also 10 min. Die Hybridisierungsmuster wurden durch eine sensitive kolorimetrische Methode sichtbar gemacht und auf den Bildschirm übertragen. Die Auswertung der Daten übernahm die Software Iconoclast, Version 2.3 (Clondia Chip Technologies). Mit dieser Software wurden die Signalintensitäten mit lokaler Hintergrundkorrektur (Backgroundkorrektur) für jeden Spot auf jedem Bild berechnet.

Die Background-korrigierten Signale waren gegeben mit $NI=1-M/BG$, wobei NI die normalisierte Intensität und M die durchschnittliche (mean) Spotintensität und BG der lokale Background bedeutet. Die Signalintensitäten bewegten sich zwischen 0 und 1.



Abbildung 7: Einsetzen des vorbereiteten ArrayTube in den ATR-01-Reader für die Auswertung

Bewertung der Hybridisierungsmuster

Die Speziesidentität einer Testprobe wurde von der Spezifität der Sonde abgeleitet welche die grösste Intensität eines Hybridisationssignals auf dem entwickelten Array zeigte. Die genus-spezifischen Sonden (*Chlamydia* und *Chlamydophila*) mussten auch erscheinen. Eine Probe wurde als negativ bewertet, wenn alle Signale ausser die 6 Färbepunkte (Biotin-Marker) unter $NI=0.007$ waren. Ebenfalls als negativ wurde eine Probe angesehen, wenn die W_chon_2-Sonde auftrat.

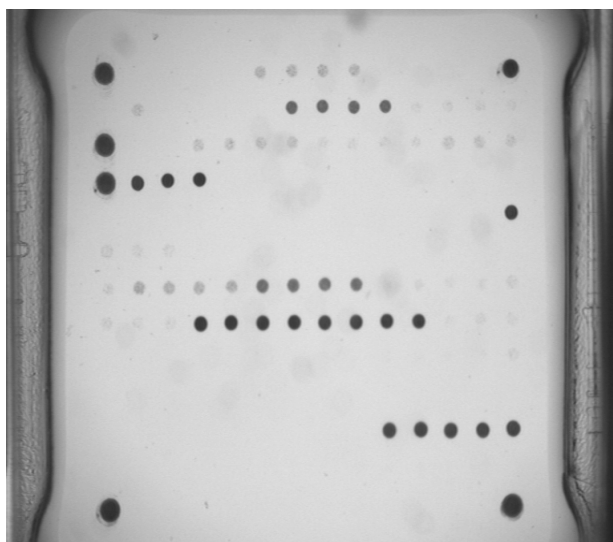


Abbildung 8: *Cp. abortus*-Muster (*Cp. abortus*-DNA in Wasser, 1000 t/ μ l) auf dem Chip (Positivkontrolle der Probenuntersuchungen)

Interpretation und Auswertung der erhaltenen Daten

Alle 60 Bilder wurden im bmp-Format abgespeichert. Es wurde zusätzlich ein PDF erstellt und ausgedruckt.

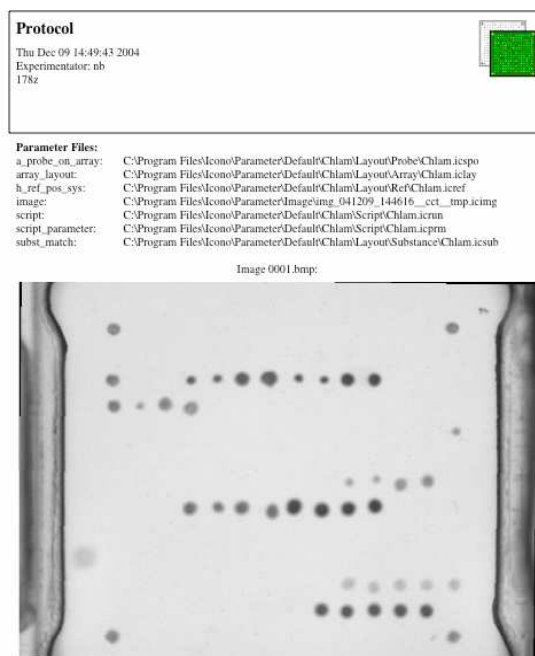


Abbildung 9: Auszug aus der Frontseite der ausgedruckten PDF-Datei

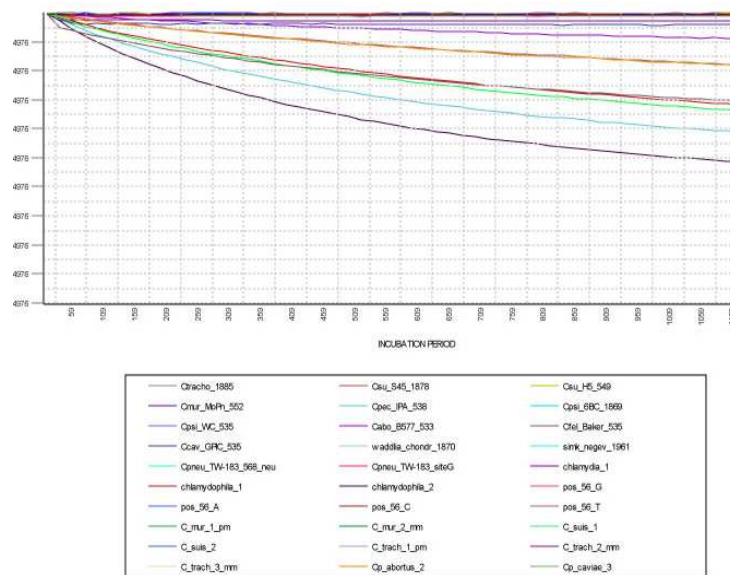


Abbildung 10: Abscheidungskinetik (Kurvendarstellung)

Die Abscheidungskurven dienen der Kontrolle ob die Messung der Bilder ohne Störung (Erschütterung, Stoss am AT-Reader) abgelaufen ist. Eine solche Erschütterung hätte sich in einer unregelmässigen Kurve angedeutet (nächstes Bild).

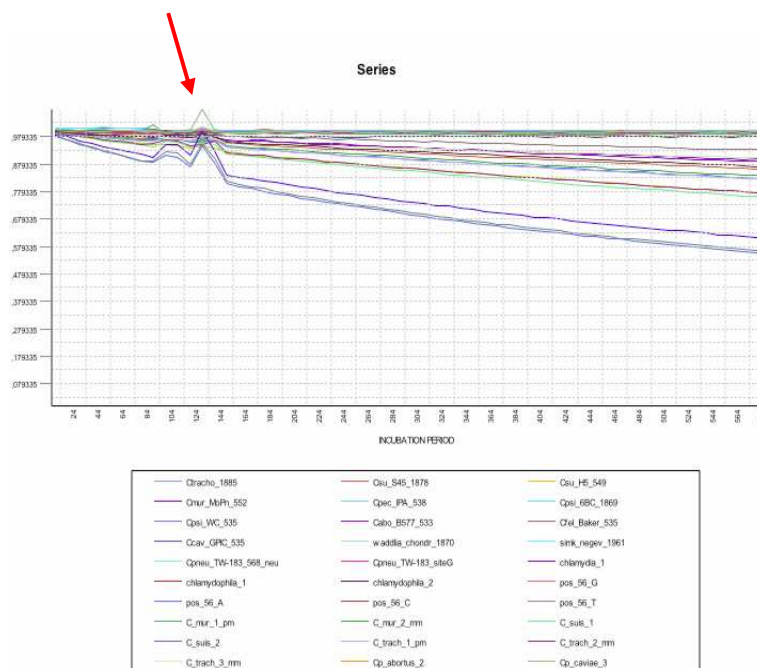
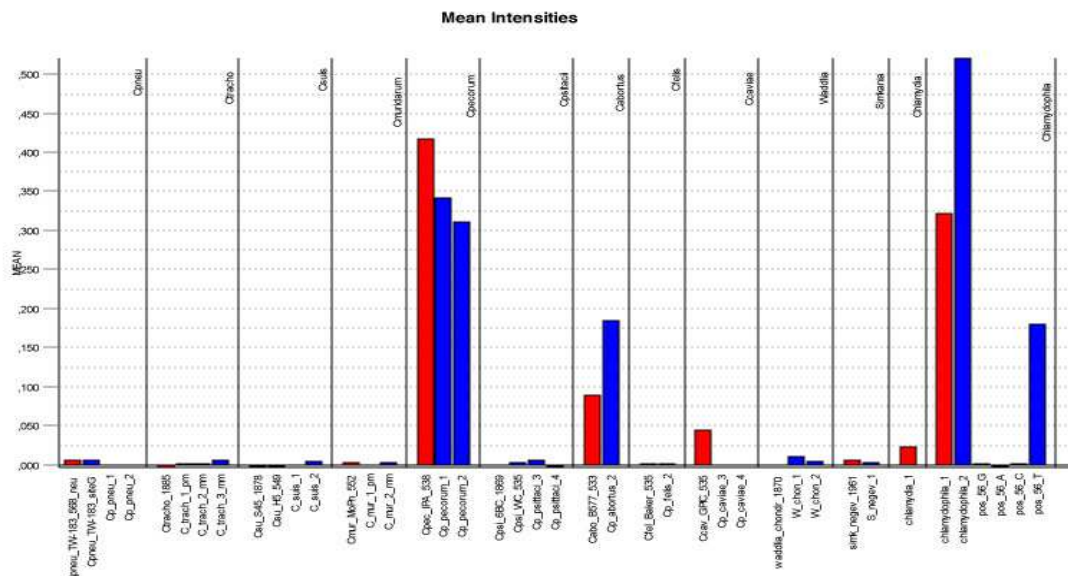


Abbildung 11: Beispiel einer unregelmässigen Abscheidungskinetik (geknickte Kurven, Pfeil) durch Erschütterung des AT-Readers.

Abbildung 13: Balkendiagramm der Mean-Werte



Die Mean-Werte waren jene Werte, die der Durchschnitt aller Pixel die als Spot auf einem Bild erkannt wurden (in der Regel vom letzten, also 60. Bild), darstellten. Davon wurde noch der Hintergrund als Wert abgezogen. Dieser Wert war also nur auf ein Bild bezogen, im Gegensatz zu den QSV_2-Werten. Mit den Mean-Werten erhielt man den lokalen „mean-background“. Bei der Kontrolle und Auswertung der Resultate sollten das Balkendiagramm der Mean- und QSV_2-Werte ähnlich aussehen, das heisst die höchsten Balken sollten von derselben Sonde stammen.

Eine Spezies war erst definiert wenn alle 3 oder 4 Säulen der entsprechenden Spezies und zusätzlich die Sonde für *Chlamydia* (Chlamydia_1) oder *Chlamydophila* (Chlamydophila_1 und Chlamydophila_2) auftraten, je nachdem ob es sich um eine *Chlamydia*- oder *Chlamydophila*-Spezies handelte.

3.3. 16S rRNA PCR

Bei dieser PCR wurden die Primerpaare 16S-IGF (5'- GAT GAG GCA TGC AAG TCG AAC G-3') und 16S-IGR (5'- CCA GTG TTG GCG GTC AAT CTC TC-3') (modifiziert nach Everett et al., 1999) benutzt und damit wurde ein Produkt von 278 bp der 16S rRNA Genregion, die spezifisch ist für die Ordnung der Chlamydiales, amplifiziert. 1 µl der extrahierten DNA wurde zum PCR-Gemisch zugegeben, dieses enthielt 3.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 µM von jedem Primer (Microsynth, Balgach, Schweiz), 5 µl eines 10x Reaktionspuffers, 2 U der AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Rotkreuz, Schweiz) und deionisiertes Wasser, um schliesslich ein Volumen von 50 µl zu erhalten. Die Amplifikation dauerte 45 Zyklen mit einer initialen Denaturierung von 95 °C für 15 min, gefolgt von einer weiteren Denaturierung von 94 °C für 30 s, einem Annealing von 51 °C für 30 s, und einer Extension bei 72 °C für 45 s.

3.4. IGS-S PCR

Die Primer cIGS-1f (5'-CAA GGT GAG GCT GAT GAC-3') und cIGS-2r (5'-TCG CCT KTC AAT GCC AAG-3') (Microsynth) amplifizierten in dem intergenic space (IGS) Bereich des rRNA Operons der *Chlamydiales* ein Fragment von 370 bp. Ein 50 µl Reaktionsvolumen mit 1 µl Template, 0.25 µM des forward Primer (cIGS-1f) und 0.5 µM des reverse Primer (cIGS-2r), 0.4 mM dNTPs, 3.5 mM MgCl₂, 5 µl des 10x Reaktionspuffers, 2.5 U der AmpliTaq Gold DNA Polymerase und deionisiertes Wasser wurde hergestellt. Das Temperaturprofil war wie bei der 16S PCR, nur die Annealing Temperatur war bei 48 °C, und die finale Extension bei 72 °C für 10 min kam noch hinzu.

3.5. IGS-L PCR

Diese PCR amplifiziert mit den Primern cIGS-1f (5'-CAA GGT GAG GCT GAT GAC-3') und IGS-1r (5'-AGT GGT CTC CCC AGA TTC-3') ein Fragment von 750 bp das wie oben beschrieben zwischen den 16S und 23S-Genregionen liegt (IGS). Das Reaktionsgemisch enthielt 1.5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, und 0.25 µM des forward Primers und 0.25 µM des reverse Primers, 5 µl des 10x Reaktionspuffers, 2.5 U der AmpliTaq Gold Polymerase und deionisiertes Wasser um ein Volumen von 50 µl zu erhalten. Das PCR Protokoll war 40 Zyklen bei einer Initialdenaturation von 94 °C, 10 min, Denaturierung 94 °C für 30 s, Annealing bei 54 °C für 30 s, und Extension bei 72 °C für 45 s.

3.6. Real-time PCR

Eine für *Chlamydiaceae* familienspezifische PCR welche die Region des 23S rRNA Gens amplifiziert wurde in 96-well Mikrotiter Platten auf einem Mx 3000 Thermal Cycler (Stratagene, La Jolla, CA) mit den Primern Ch23S-F (5'-CTG AAA CCA GTA GCT TAT AAG CGG T-3'), Ch23S-R (5'-ACC TCG CCG TTT AAC TTA ACT CC-3') und der Sonde Ch23-p (FAM CTC ATC ATG CAA AAG GCA CGC CG-TAMRA) als weitere Referenz durchgeführt. Jedes Reaktionsgemisch enthielt 1 µl Proben DNA Template, 12.5 µl qPCR Mastermix Plus (Eurogentec, Seraing, Belgien), 4.5 µl von jedem Primer und 1 µl des Sondenprimers (von 5 µM Lösungen), und 1.5 µl deionisiertes Wasser. Das Temperaturprofil war 95 °C für 10 min, 45 Zyklen von 95 °C für 15 s und 60 °C für 60 s.

Alle Proben wurden mindestens zweimal untersucht.

Ct-Werte unter 40 wurden als positiv für *Chlamydiaceae*, zwischen 40 und 45 fraglich und über 45 als negativ gewertet.

3.7. Immunhistochemie für Chlamydien

Es wurden Paraffinblöcke untersucht, indem ein *Chlamydiaceae*-familienspezifischer monoklonaler Maus-Antikörper (Ab), der direkt gegen das chlamydiale Lipopolysaccharid (LPS; Clone ACI-P, Progen, Heidelberg, Deutschland) gerichtet ist, benutzt wurde. Die Detektion erfolgte mit dem Detektions Kit (Dako ChemMate[™], Glostrup, Dänemark) nach Angaben des Herstellers. Die Paraffinblöcke wurden mit Xylol entparaffiniert und mit einer absteigenden Verdünnungsreihe von Ethanol in Wasser rehydriert.

Die Schnitte wurden mit einem Enzymverdauung (10 min) behandelt (Pronase, Dako).

Um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren, wurden die Schnitte in Peroxidase-Blocker-Lösung bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und mit dem ersten Antikörper, der in Ab-Verdünnungsmittel mit Hintergrund reduzierenden Substanzen gelöst war, zusammengebracht (60 min). Danach wurden die Schnitte mit dem link-Ab inkubiert (RT, 30 min), in 3-amino, 9-ethyl-carbazole (AEC) Substrat Lösung (10 min) entwickelt und schliesslich mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Für jeden Schnitt wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, indem anstatt dem ersten Antikörper das Ab-Verdünnungsmittel benützt wurde.

Därme von experimentell mit Chlamydien infizierten gnotobiotischen Ferkeln wurden als Positivkontrollen genutzt (*C. suis*-Stamm S45, Guscetti et al., 1998b und 2000).

3.8. Gelelektrophorese, DNA-Aufreinigung und Sequenzierung

Für die Gelelektrophorese wurden 1,5 g Agarose mit 100 ml 50x TAE-Puffer gemischt. Die Lösung wurde unter Rühren erhitzt bis die Agarose gelöst war und die Flüssigkeit klar wurde. Dann wurde für die Anfärbung der DNA-Probe Ethidiumbromid dazugegeben.

Die Lösung wurde in die Gelkammer gefüllt (Höhe des Geles ca. 0,5 cm) und der Kamm wurde eingelassen.

Nach Erhärten des Geles (20 min bei RT) wurde es in die Laufkammer gelegt und diese mit 1x TAE-Puffer gefüllt. Der Kamm wurde gezogen und die DNA-Proben (6 µl) mit Laufpuffer („Bluejuice“) gemischt und in die durch den Kamm ausgesparten Taschen der Reihe nach eingefüllt.

Zur Kontrolle der Banden, respektive der Länge der in der Probe allenfalls vorhandenen DNA, wurde der VIII Marker mitgeführt.

Das Gerät mit dem Gel wurde an das Netzgerät angeschlossen und mit 200 mA und ca. 110 Volt (10V pro cm Gellänge) für 20 min laufen gelassen. Dann wurde eine digitale Fotografie des Geles gemacht während es in der UV-Kammer lag.

Für die Sequenzierung wurden die Banden im Gel herausgeschnitten und die enthaltene DNA mit dem Eluations-Kit (MinElute PCR Purification Kit, Qiagen, Valencia, USA) aufgereinigt. Die so behandelte Probe wurde zum Sequenzierservice der Universität Zürich gebracht (ABI 3100, Kapillar Elektrophoresegerät) und die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Daten der GenBank verglichen (BLAST Server des National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

4. Statistische Analysen

Für die statistischen Berechnungen der diagnostischen Parameter wurde die Bayesian Methode (Markov Chain Monte Carlo) angewandt. Es wurden 293 Proben einbezogen, 40 von experimentell infizierten Tieren stammend. Von diesen 40 Proben wurde angenommen, dass sie eine andere Infektionsstärke besitzen als die klinischen Proben.

Es wurde nicht für jede Probe der genaue Infektionsstatus überprüft, aber mit mindestens zwei anderen Methoden die Infektion bestätigt.

Für 73 Proben wurden vier weitere Tests durchgeführt, für weitere 39 drei, und für 141 zwei. Bei den 40 experimentell infizierten Tieren wurde nur der AT-Test durchgeführt.

Die Spezifität der verschiedenen DNA Tests wurde als 1 definiert. So war es möglich das Model zu erarbeiten, auch wenn angenommen werden musste, dass die Sensitivitäten der verschiedenen DNA Tests variieren.

V Resultate

1. Vorbemerkungen

Die W_chon_2-Sonde trat häufig auf, auch in den Negativkontrollen (Negativkontrollen einer Probenreihe heisst nur Mastermix ohne Template).

Die besagten Proben zeigten auch auf den Gelbildern eine Bande bei ca. 170 bp.

Die Sequenzierung des amplifizierten DNA-Abschnittes ergab eine 99% Homologie mit dem 23S Ribosomalen Gen von *E. coli*. Die benutzte Polymerase (TaqGold) wird rekombinant aus *E. coli* hergestellt und danach aufgereinigt.

Die Primer, die für die 23S-PCR (AT-System) benutzt werden sind demnach in der Lage auch *E. coli* zu amplifizieren.

Untersucht man nun Feldproben ist es möglich, dass sich im Untersuchungsgut auch *E. coli*-Bakterien befinden. Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass sich unter Umständen noch *E. coli*-DNA-Fragmente in der Polymerase befinden.

Wegen der hohen Sensitivität der PCR reicht theoretisch ein einziges DNA-Fragment aus um eine signifikante Amplifikation zu erreichen, welche man dann auf dem Gel oder allenfalls sogar auf dem Chip sieht. In diesem Fall hybridisieren die Proben-DNA-Sequenzen aber nur mit der W_chon_2-Sonde.

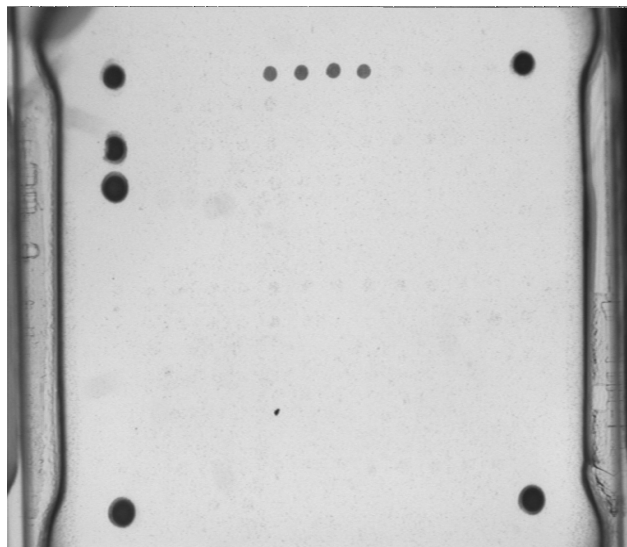


Abbildung 14: Negativkontrolle (nur Mastermix, nach der Amplifikation) mit Erscheinen der W_chon_2-Sonde. Dieses Bild wurde als negativ (kein Signal) bewertet.

Es gibt in der Ordnung Chlamydiales viele Spezies die noch nicht entdeckt und beschrieben sind, jedoch in gewisser Masse zu den Chlamydien gezählt werden, denn sie haben den gleichen Entwicklungszyklus wie die *Chlamydiaceae*. Man nennt sie der Einfachheit halber „Chlamydia-like-Spezies“ oder Uncultured Chlamydiales. Über ihre Rolle als Pathogene ist noch wenig bekannt, die Erforschung jener Spezies steckt noch in den Kinderschuhen. Einige scheinen ubiquitär in der belebten Welt vorzukommen ohne Krankheiten hervorzurufen. In dieser Studie wurde nur auf die 9 bekanntlich pathogenen *Chlamydiaceae*-Spezies eingegangen. Uncultured Chlamydiales wurden auf dem AT nicht angezeigt. In einigen Fällen aber, bei denen sich Uncultured Chlamydiales in der Probe befanden, kam die W_chon_2-Sonde zum Vorschein.

Die mit den 23S-F- und 23S-R-bio-Primer amplifizierten PCR-Produkte wurden zur Kontrolle auf einem 1,5% Agarose-Gel aufgetrennt. Dazu wurden 6 µl des Amplifikates mit ca. 1 µl Ladepuffer (Bluejuice) gemischt und in die Kammtaschen des Geles gegeben. Weil aber die Sensitivität des ArrayTube-Systems höher war als die Sichtbarmachung der Banden mittels eines Gels (keine sichtbare Bande im Gel, aber ein deutliches Signal auf dem Chip) wurde später auf die Kontrolle durch die Gelanalyse verzichtet oder nur noch in speziellen Fällen durchgeführt.

Total wurden 340 Proben untersucht. Es wurden Proben aus der Klinik und experimentell infizierte Gewebe mit dem AT und mit mindestens einem Referenztest für Chlamydien untersucht.

Die *Chlamydiaceae*-spezifische Real-time PCR, welche die 23S rRNA Genregion amplifiziert, wurde für die Tupfer, Milch, Kot und andere Körperflüssigkeiten als Referenzmethode gewählt.

Ausserdem wurde die 16S PCR, IGS-S- und -L PCRs, die nested *ompA* PCR und partielle *ompA*-Gen Sequenzierung und die Immunhistochemie und Antigen-ELISA bei einigen Proben zur Verifizierung des Array Resultates durchgeführt. Der AT-Test wurde auch zur Speziesidentifizierung aus Zellkulturen zu Rate gezogen (n = 57).

Schliesslich wurden noch 46 andere Bakterien (DNA) und eine Pilzspezies (*Candida spp.*) auf dem AT getestet um dessen Spezifität zu zeigen (n = 47).

Alle Resultate wurden statistisch ausgewertet.

2. Resultate formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe (n = 152)

Im Ganzen wurden 152 Proben untersucht. Anhand vorangegangener Untersuchungen wurden die Proben in Chlamydia-positive bzw. Chlamydia-negative Fälle eingeteilt.

2.1. Chlamydien-positive Fälle (n = 57)

Die Resultate der 57 in der 16S PCR oder anderen Tests positiv getesteten Proben sind in den Tabellen 1-5b gezeigt. Es wurden 6 verschiedene Spezies identifiziert, *Cp. abortus* bei Plazenten von Schafen, Rindern und einem Menschen, *Cp. psittaci* bei Vögeln, Rindern und Schweinen, *Cp. pneumoniae* bei Fröschen und Schlangen und *Cp. pecorum*, *C. trachomatis* und *C. suis* bei experimentell infizierten gnotobiotischen Ferkeln.

Während bei 44 Fällen das AT Resultat mit anderen Testverfahren übereinstimmte, wurde in 9 Fällen auf dem AT ein anderes Resultat erhalten.

Tab. 1: Aborte von Schaf und Ziege (Fetale Organe oder Plazenta) (n = 15)

Nr	Proben ID	Herkunft	16S PCR	IHC	Histologischer Befund	Bakteriologie	AT-Test
1	S97-0160.1	Fet. Lunge, Leber	<i>Cp. abortus</i>	Lunge: positiv; Leber: negativ	Interst. Pneumonie	Labmagen: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
2	S97-0160.3	Fet. Zunge, Thymus	<i>Cp. abortus</i>	Zunge: positiv; Thymus: negativ	Nekrotisierende Thymitis	Labmagen: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
3	S97-0212.1	Fet. Lunge, Leber	<i>Cp. abortus</i>	Leber: negativ; Lunge: positiv	Hepatitis	Leber, Milz, Niere: negativ	<i>Cp. abortus</i>
4	S97-0220.3	Plazenta	<i>Cp. psittaci</i>	positiv	Nekrotisierende Plazentitis, Vaskulitis	Plazenta: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
5	S97-0339.2	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	positiv	Bronchopneumonie	Labmagen: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
6	S97-0369.1	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	positiv	Nekrotisierende Plazentitis, Vaskulitis	Plazenta: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
7	S97-0419.1	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	positiv	Nekrotisierende Plazentitis, Vaskulitis	Plazenta: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
8	S97-0421.1	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	positiv	Eitrig-nekrotisierende Plazentitis	Plazenta: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
9	S98-0440.8	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	positiv	Nekrotisierende Plazentitis	Plazenta: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
10	S98-0495.1	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	positiv	Nekrotisierende Plazentitis	Plazenta: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
11	S97-0304.1	Plazenta	Uncult. <i>Chlamydiales</i>	positiv	Nekrotisierende Plazentitis, Vaskulitis	Alle Organe: negativ	<i>Cp. abortus</i>
12	S97-0422.1	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	positiv	Nekrotisierende Plazentitis	Plazenta: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
13	S03-0095.2	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	positiv	Eitrig-nekrotisierende Plazentitis	Plazenta: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
14	S98-0620.1	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	positiv	Nekrotisierende Plazentitis	Plazenta: <i>Chlamydien</i>	<i>Cp. abortus</i>
15	S97-0618.5	Fet. Muskel: <i>Toxoplasma sp.</i>	<i>Cp. abortus</i>	positiv	eitrige Myositis	negativ	<i>Cp. abortus</i>

Alle 15 Fälle welche in der IHC positiv waren wurden mit dem AT als *Cp. abortus* erkannt. Bei einem Fall (Nr. 11) wurde bei der 16S-PCR *Cp. abortus* nicht erkannt (uncultured *Chlamydiales*). Nr. 15 war zusätzlich mit *Toxoplasma* infiziert.

Tab. 2: **Aborte vom Rind** (Plazenta) (n = 11)

Nr.	Proben ID	Herkunft	16S PCR	IGS-S PCR	IHC	Histologischer Befund	AT-Test
1	H03-2014	Plazenta	<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. abortus</i>	negativ	Eitrig-nekr. Plazentitis, Vaskulitis	Kein Signal
2	H03-2322	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>	negativ	Eitrig-nekr. Plazentitis	<i>Cp. abortus</i>
3	H03-2467	Plazenta	<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>	negativ	Eitrig-nekr. Plazentitis	Kein Signal
4	H03-2503	Plazenta	<i>Cp. psittaci</i>	negativ	negativ	Eitrig-nekr. Plazentitis	Kein Signal
5	H03-2505	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	negativ	negativ	Eitrig-nekr. Plazentitis, Vaskulitis	<i>Cp. abortus</i>
6	H03-2640	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	negativ	negativ	Nekr. Plazentitis	Kein Signal
7	H03-2637	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>	fraglich	Eitrig-nekr. Plazentitis, Vaskulitis	<i>Cp. abortus</i>
8	H03-2733	Plazenta	<i>Cp. psittaci</i>	negativ	negativ	Autolyse, n.b.	Kein Signal
9	H03-3336	Plazenta	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>	positiv	Eitrig-nekr. Plazentitis, Vaskulitis	<i>Cp. abortus</i>
10	H01-3571	Plazenta	<i>Cp. psittaci</i>	negativ	fraglich	Eitrig-nekr. Plazentitis, Vaskulitis	Kein Signal
11	H01-3572	Plazenta	<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>	fraglich	Eitrig-nekr. Plazentitis, Vaskulitis	<i>Cp. psittaci</i>

6 Fälle (Nr. 1, 3, 4, 6, 8 und 10) ergaben kein Signal (54.5 %).

Die IHC war ausser in einem Fall (Nr. 9) negativ oder fraglich (81.8 %).

Der menschliche Abort (Pospischil et al., 2002a, nicht in der Tabelle aufgeführt) war *Cp. abortus*-positiv in der IHC (*Chlamydiaceae*-positiv) und 16S PCR als auch im AT-Test.

Tab. 3: Organe von Reptilien und Fröschen (n = 6)

Nr.	Proben ID	Herkunft	16S PCR	IHC	Histologischer Befund	Bakteriologie	AT-Test
1	S95-0852.3	Frosch: verschiedene Organe	<i>Cp. pneumoniae</i>	negativ	Enteritis	Leber: keine Bakt.	<i>Cp. pneumoniae</i>
2	S95-2040.3	Frosch: verschiedene Organe	<i>Cp. pneumoniae</i>	negativ	Enteritis, fettige Leberdegeneration	Leber: unspez. Keimgehalt	<i>Cp. pneumoniae</i>
3	S95-2040.12	Frosch: verschiedene Organe	<i>Cp. pneumoniae</i>	negativ	Enteritis, fettige Leberdegeneration	Leber: unspez. Keimgehalt	<i>Cp. pneumoniae</i>
4	S91-1158	Schlange: verschiedene Organe	<i>C. suis</i>	positiv	Pankreatitis, Pneumonie	Leber: <i>Salmonella spp.</i>	<i>Cp. pneumoniae</i>
5	Z04-3467	Schlange: verschiedene Organe	<i>Cp. pneumoniae</i>	positiv	Hepatitis, Myokarditis, Perikarditis	nicht gemacht	<i>Cp. pneumoniae</i>
6	Z04-3522	Schlange: verschiedene Organe	<i>Cp. pneumoniae</i>	positiv	Perikarditis, Serositis, Nekrose in der Leber	nicht gemacht	<i>Cp. pneumoniae</i>

Bei Nr. 4 ist *Cp. pneumoniae* wahrscheinlich, denn Reptilien beherbergen eher diese Spezies und nicht *C. suis* (natürlicher Wirt von *C. suis* ist das Schwein). In 3 Fällen war die IHC negativ (Nr. 1, 2, und 3) was durch die geringere Sensitivität im Gegensatz zu den PCR-Methoden zu erklären ist

Tab. 4: **Organe von Vögeln mit Psittakose** (n = 11)

Nr.	Proben ID	Herkunft	16S PCR	IHC	Histologischer Befund	IDEA-Antigen-ELISA	Bakteriologie	AT-Test
1	H04-0308.3	Leber	<i>Cp. psittaci</i>			positiv	Leber: unspez. Keimgehalt	<i>Cp. psittaci</i>
2	H04-0360.1	Leber, Lunge, Niere	<i>Cp. psittaci</i>			positiv	Leber, Lunge: Chlamydien	<i>Cp. psittaci</i>
3	H04-0386.1	Leber, Lunge, Niere	<i>Cp. psittaci</i>	positiv	Hepatitis, Pneumonie	positiv		<i>Cp. psittaci</i>
4	H04-1045.1	Leber, Lunge, Herz	<i>Cp. psittaci</i>			positiv	Leber, Lunge: Chlamydien	<i>Cp. psittaci</i>
5	H04-3213.1	Lunge, Niere	<i>Cp. psittaci</i>			positiv	Leber, Milz: Chlamydien	<i>Cp. psittaci</i>
6	H04-4732.2	Leber	<i>Cp. psittaci</i>			positiv	Leber, Milz: Chlamydien	<i>Cp. psittaci</i>
7	H05-0596.2	Leber, Lunge, Darm	negativ				Leber: Chlamydien	<i>Cp. psittaci</i>
8	H05-0677.1	Leber, Lunge, Herz	<i>Cp. psittaci</i>	negativ	keine pathologischen Veränderungen		negativ	kein Signal
9	H05-0761.1	Leber, Lunge, Niere	<i>Cp. psittaci</i>				Leber: Chlamydien	<i>Cp. psittaci</i>
10	H05-3366.1	Leber, Lunge, Niere, Darm	<i>C. suis</i>	negativ	keine pathologischen Veränderungen		Leber, Lunge, Milz: keine Chlamydien	<i>C. suis</i>
11	H96-0663.1	Leber	<i>Cp. pneumoniae</i>	positiv	Hepatitis			<i>Cp. psittaci</i>

9 Fälle wurden im AT als *Cp. psittaci* detektiert. In einem Fall (Nr. 7) war die 16S-PCR negativ im Gel und zeigte aber auf dem AT erwartungsgemäss *Cp. psittaci*. In diesem einen Fall scheint die AT-Methode sensitiver zu sein als die 16S PCR. Am wahrscheinlichsten aber ist, dass bei der 16S-PCR-Vorbereitung (pipettieren) keine Ziel-DNA aufgesogen wurde (sehr wenig DNA in der Probe). Im Fall 8 aber ist die Situation umgekehrt, das heisst nur die 16S PCR konnte *Cp. psittaci* detektieren.

Fall 10 ist höchstwahrscheinlich eine Kontamination mit *C. suis* in der Probe. Theoretisch wäre auch ein symptomloses Trägertum mit dieser Chlamydienart (*C. suis*) möglich.

Zu Nr. 11 ist zu sagen, dass *Cp. psittaci* (AT) sehr viel wahrscheinlicher scheint als *Cp. pneumoniae*. Ausserdem spricht die Symptomatik (Hepatitis) und die Tierart (Vogel) auch für *Cp. psittaci*.

Zusatzuntersuchungen wie IDEA-Antigen-ELISA, IHC und Bakteriologie (Abklatsch von Organen und anschliessende Spezialfärbung mit Betrachtung unter dem Mikroskop) wurde nur in Einzelfällen am Institut für Veterinärbakteriologie Zürich durchgeführt.

Tab. 5a: Dünndärme von experimentell mit Chlamydien infizierten gnotobiotischen Ferkeln (n = 9)

Nr.	Proben ID	Herkunft	AT-Test
1	S93-2534.31	Ileum, mit <i>Cp. pecorum</i> infiziert	<i>Cp. pecorum</i>
2	S93-2541.28	Jejunum, mit <i>Cp. pecorum</i> infiziert	<i>Cp. pecorum</i>
3	S93-2546.35	Jejunum, mit <i>Cp. pecorum</i> infiziert	<i>Cp. pecorum</i>
4	S93-2574.33	Jejunum, mit <i>Cp. pecorum</i> infiziert	kein Signal
5	S94-2428.27	Jejunum, mit <i>Cp. pecorum</i> infiziert	<i>Cp. pecorum</i>
6	S94-0946.29	Jejunum, mit <i>C. trachomatis</i> infiziert	kein Signal
7	S94-0948.31	Jejunum, mit <i>C. trachomatis</i> infiziert	<i>C. trachomatis</i>
8	S95-0464.29	Jejunum, mit <i>Cp. psittaci</i> infiziert	<i>Cp. psittaci</i>
9	S95-0477.34	Jejunum, mit <i>Cp. psittaci</i> infiziert	<i>Cp. psittaci</i>

Diese Ferkel wurden experimentell infiziert (Guscetti et al., 1998b), deshalb wurde auf eine Referenzmethode (16S PCR) als Kontrolle verzichtet. In 2 Fällen (Nr. 4 und 6) blieb der Chip ohne Signal. Beide Proben wurden wiederholt und blieben auch beim zweiten Mal negativ.

Tab. 5b: Organ-Homogenat von natürlich an Chlamydiose erkrankten Ferkeln (aus dem Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit in Jena) (n = 4)

Nr.	Proben ID	Herkunft	Real-time PCR <i>Chlamydiaceae</i> (C _t)	AT-Test
1	BY-22	Ferkel, Homogenat aus verschiedenen Organen	38,1	<i>C. suis</i>
2	BY-23	Ferkel, Homogenat aus verschiedenen Organen	35,7	<i>C. suis</i>
3	BY-24	Ferkel, Homogenat aus verschiedenen Organen	34,2	<i>C. suis</i>
4	BY-25	Ferkel, Homogenat aus verschiedenen Organen	37,2	<i>C. suis</i>

Alle Ferkel waren *C. suis*-positiv auf dem Chip und *Chlamydiaceae*-positiv in der Real-time PCR. In diesem Experiment beträgt die Sensitivität und Spezifität des AT-Systems 1.

2.2. Chlamydien-negative Fälle (n = 38)

Um die Spezifität des AT-Systems zu ermitteln wurden aus den gleichen Probenpools wie von 2.1. Organe verschiedener Tierarten ohne Chlamydieninfektionen untersucht. Total wurden 38 Proben untersucht. Alle untersuchten Proben zeigten auf dem AT kein Signal.

Tab. 6: Aborte von Schaf und Ziege (fetale Organe und Plazenta) (n = 11)

Nr.	Proben ID	Herkunft	16S PCR	IHC	Histologie	Bakteriologie	AT-Test
1	S96-2718.1	Plazenta	uncult. Chlamydiales	negativ	Plazenta, Lunge, Niere: Hämorrhagie	negativ	kein Signal
2	S97-0474.2	Plazenta	negativ	negativ	keine Entzündung	negativ	kein Signal
3	S97-0825.2	Plazenta	negativ	negativ	keine Entzündung	negativ	kein Signal
4	S98-0517.2	Plazenta	negativ	negativ	keine Entzündung	negativ	kein Signal
5	S97-0466.6	Fet. Milz: <i>Escherichia coli</i>	uncult. Chlamydiales	negativ	eitrige Splenitis, interst. Pneumonie	<i>E. coli</i>	kein Signal
6	S97-0976.2	Fet. Leber, Lunge: <i>E. coli</i> + <i>Streptococcus sp.</i>	negativ	negativ	eitrig-nekrotisierende Plazentitis	<i>E. coli</i> + <i>Streptococcus sp.</i>	kein Signal
7	S97-0370.1	Fet. Leber, Lunge: <i>Streptococcus sp.</i>	negativ	negativ	interst. Pneumonie, Splenitis, Lymphadenitis	<i>Streptococcus sp.</i>	kein Signal
8	S97-0268.1	Fet. Leber: <i>Listeria sp.</i>	uncult. Chlamydiales	negativ	Nekrosen in diversen Organen, Meningitis	<i>Listeria monocytogenes</i>	kein Signal
9	S97-0535.2	Fet. Niere, Lunge: <i>Enterococcus sp.</i>	negativ	negativ	Plazentitis	<i>Enterococcus sp.</i>	kein Signal
10	S98-0250.2	Fet. Niere, Lunge: <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	negativ	negativ	Bakterienemboli in diversen Organen	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	kein Signal
11	S97-0247.1	Plazenta: <i>Coxiella burnetii</i>	negativ	negativ	nekrotisierende Plazentitis	<i>Coxiella burnetii</i>	kein Signal

Alle 11 Schafaborte (Plazenta oder fetale Organe) hervorgerufen durch verschiedene andere Erreger waren im AT negativ.

Tab. 7: **Aborte beim Rind, Plazenta** (n = 14)

Nr.	Proben ID	Herkunft	16S PCR	IGS-S PCR	IHC	Histologie	AT-Test
1	H03-2013	Plazenta	uncult. Chlamydiales	<i>Cp. abortus</i>	negativ	Autolyse, n.b.	kein Signal
2	H03-2321	Plazenta	uncult. Chlamydiales	<i>Cp. abortus</i>	negativ	keine Entzündung	kein Signal
3	H03-2850	Plazenta	negativ	<i>Cp. abortus</i>	negativ	Autolyse, n.b.	kein Signal
4	H03-2854	Plazenta	negativ	<i>Cp. abortus</i>	negativ	eitrig-nekr. Plazentitis	kein Signal
5	H03-3382	Plazenta	negativ	<i>Cp. abortus</i>	fraglich	eitrig-nekr. Plazentitis	kein Signal
6	H03-3148	Plazenta	negativ	negativ	negativ	keine Entzündung	kein Signal
7	H03-3151	Plazenta	negativ	negativ	negativ	keine Entzündung	kein Signal
8	H03-2077	Plazenta	negativ	negativ	negativ	keine Entzündung	kein Signal
9	H03-2379	Plazenta	negativ	negativ	negativ	keine Entzündung	kein Signal
10	H03-2428	Plazenta	negativ	negativ	negativ	keine Entzündung	kein Signal
11	H03-3333	Plazenta	negativ	negativ	negativ	Autolyse, n.b.	kein Signal
12	H03-2507	Plazenta	negativ	negativ	negativ	eitrig-nekr. Plazentitis	kein Signal
13	H03-2075	Plazenta	negativ	negativ	negativ	eitrig-nekr. Plazentitis	kein Signal
14	H03-2385	Plazenta	negativ	negativ	negativ	eitrig-nekr. Plazentitis	kein Signal

Nr. 5 war in der IHC fraglich und ergab bei der IGS-S-PCR *Cp. abortus*. Die 16S-PCR war jedoch negativ und auch der AT zeigte kein Signal.

Auch bei Nr. 1, 2, 3 und 4 wurde bei der IGS-S-PCR *Cp. abortus* detektiert, aber auch hier blieb der AT negativ. Es ist nicht bekannt, dass die IGS-S-PCR sensitiver als die 16S-PCR ist (diese war in allen Fällen negativ) weshalb von einer Kontamination bei der IGS-S-PCR ausgegangen werden muss.

Tab. 8: **Organe von Reptilien, Salmonellosen und Mykobakteriosen** (n = 4)

Nr.	Proben ID	Herkunft	16S PCR	IHC	Histologie	Bakteriologie	AT-Test
1	S01-1910	Schlange: Leber	negativ	negativ	Hepatitis, Splenitis, Myositis	Darm: <i>Salmonella sp.</i> ; Leber: <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	kein Signal
2	S03-2056	Schildkröte: Leber und Lunge	negativ	negativ	Hepatitis	Leber: Mykobakterien	kein Signal
3	S04-0390	Agave: verschiedene Organe	negativ	negativ	Granulome in versch. Organen	Lunge: Mykobakterien	kein Signal
4	S04-0457	Leguan: Herz und Nieren	negativ	negativ	Lunge: Granulome	Lunge: <i>Salmonella sp.</i>	kein Signal

Alle Fälle von Reptilien mit anderen bakteriellen Infektionen zeigten auf dem AT kein Signal. Zusätzlich waren auch die 16S PCR und die IHC negativ.

Tab. 9: Organe von Vögeln (n = 6)

Nr.	Proben ID	Herkunft	16S PCR	IHC	Histologie	Bakteriologie	AT-Test
1	H04-1849.1	Leber, Lunge, Niere, Magen	negativ	negativ	Pneumonie	Leber: negativ (kulturell)	kein Signal
2	H04-3857.2	Leber	negativ	negativ	granulomatöse Hepatitis	nicht gemacht	kein Signal
3	H04-4284.1	Leber, Lunge, Niere, Magen	negativ	negativ	Hepatitis	Leber: negativ	kein Signal
4	H05-2726.1	Leber, Lunge	uncult. Chlamydiales	negativ	Pneumonie	Leber, Lunge, Milz: keine Chlamydien	kein Signal
5	H04-2315.1	Leber, Lunge	negativ	negativ	keine pathologischen Veränderungen	negativ	kein Signal
6	H04-3214.1	Leber, Lunge, Niere, Herz	negativ	negativ	keine pathologischen Veränderungen	nicht gemacht	kein Signal

Keiner der negativen Proben von den Vogelorganen zeigte auf dem AT ein Signal. Nur bei einem Fall (Nr. 4) wurden bei der 16S PCR uncultured Chlamydiales gefunden.

Tab. 10: Därme von gnotobiotischen Ferkeln ohne Infektion (Negativkontrollen) (n = 3)

Nr.	Proben ID	Herkunft	AT-Test
1	S94-2427.17	Jejunum, Kontrolle der Pecorumlinie	kein Signal
2	S94-0945.4	Jejunum, Kontrolle der Trachomatislinie	kein Signal
3	S95-0460.28	Jejunum, Kontrolle der Psittacilinie	kein Signal

Alle Negativkontrollen zeigten auf dem AT kein Signal.

2.3. Zellpellets und Zellkulturen (n = 57)

57 Chlamydien-Zellkulturen wurden mit dem AT Mikroarray getestet. Der Vergleich mit den verschiedenen Tests (PCR und AT) zeigt, dass alle 26 Zellkulturen übereinstimmen (Tabelle 13). Zusätzlich zeigt die Untersuchung von 29 Proben experimentell infizierter Zellpellets, dass der AT in der Lage ist sogar Doppel- und Mehrfachinfektionen zu entdecken. Bis zu 5 verschiedene Spezies werden in einer Probe unterschieden.

Tab. 11: Experimentell mit Chlamydienstämmen infizierte Zellpellets (n = 9)

Mono-Infektionen

Nr.	Proben ID	Stamm: Spezies	AT- Test
1	A	T49/90: <i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
2	B	S26/3: <i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>
3	C	S45/6: <i>C. suis</i>	<i>C. suis</i>
4	D	K6: <i>Cp. pneumoniae</i>	<i>Cp. pneumoniae</i>
5	E	1710S: <i>Cp. pecorum</i>	<i>Cp. pecorum</i>
6	F	W73: <i>Cp. pecorum</i>	<i>Cp. pecorum</i>
7	G	LGV434: <i>C. trachomatis</i>	<i>C. trachomatis</i>
8	CP3	keine Infektion, Negativkontrolle	kein Signal
9	GG28	Amöbenpellet: <i>Parachlamydia Halli coccus</i>	kein Signal

Alle Monoinfektionen wurden auf dem AT als die entsprechende Spezies erkannt. Die Negativkontrolle und die mit *Parachlamydia Halli coccus* infizierten Amöben zeigten auf dem AT kein Signal (Nr. 8 und 9).

Tab. 12: experimentell mit Chlamydienstämmen infizierte Zellpellets (n = 22)

Doppel- und Mehrfachinfektionen

Nr.	Proben ID	Mischkomponenten	AT-Test
1	A/B	<i>Cp. psittaci</i> + <i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. psittaci</i> + <i>Cp. abortus</i>
2	A/C	<i>Cp. psittaci</i> + <i>C. suis</i>	<i>Cp. psittaci</i> + <i>C. suis</i>
3	A/D	<i>Cp. psittaci</i> + <i>Cp. pneumoniae</i>	<i>Cp. psittaci</i> + <i>Cp. pneumoniae</i>
4	A/E	<i>Cp. psittaci</i> + <i>Cp. pecorum</i>	<i>Cp. psittaci</i> + <i>Cp. pecorum</i>
5	A/F	<i>Cp. psittaci</i> + <i>Cp. pecorum</i>	<i>Cp. psittaci</i> + <i>Cp. pecorum</i>
6	A/G	<i>Cp. psittaci</i> + <i>C. trachomatis</i>	<i>Cp. psittaci</i> + <i>C. trachomatis</i>
7	B/C	<i>Cp. abortus</i> + <i>C. suis</i>	<i>Cp. abortus</i> + <i>C. suis</i>
8	B/D	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pneumoniae</i>	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pneumoniae</i>
9	B/E	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
10	B/F	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
11	B/G	<i>C. trachomatis</i> + <i>Cp. abortus</i>	<i>C. trachomatis</i> + <i>Cp. abortus</i>
12	C/D	<i>C. suis</i> + <i>Cp. pneumoniae</i>	<i>C. suis</i> + <i>Cp. pneumoniae</i>
13	C/E	<i>C. suis</i> + <i>Cp. pecorum</i>	<i>C. suis</i> + <i>Cp. pecorum</i>
14	C/F	<i>C. suis</i> + <i>Cp. pecorum</i>	<i>C. suis</i> + <i>Cp. pecorum</i>
15	C/G	<i>C. suis</i> + <i>C. trachomatis</i>	<i>C. trachomatis</i>
16	D/E	<i>Cp. pneumoniae</i> + <i>Cp. pecorum</i>	<i>Cp. pneumoniae</i> + <i>Cp. pecorum</i>
17	D/F	<i>Cp. pneumoniae</i> + <i>Cp. pecorum</i>	<i>Cp. pneumoniae</i> + <i>Cp. pecorum</i>
18	D/G	<i>Cp. pneumoniae</i> + <i>C. trachomatis</i>	<i>Cp. pneumoniae</i> + <i>C. trachomatis</i>
19	E/F	<i>Cp. pecorum</i> (1710S) + <i>Cp. pecorum</i> (W73)	<i>Cp. pecorum</i>
20	E/G	<i>Cp. pecorum</i> + <i>C. trachomatis</i>	<i>Cp. pecorum</i> + <i>C. trachomatis</i>
21	F/G	<i>Cp. pecorum</i> + <i>C. trachomatis</i>	<i>Cp. pecorum</i> + <i>C. trachomatis</i>
22	ZPA II	<i>Cp. abortus</i> , <i>Cp. pecorum</i> , <i>Cp. psittaci</i> , <i>Cp. pneumoniae</i> + <i>C. suis</i>	<i>Cp. abortus</i> , <i>Cp. pecorum</i> , <i>Cp. psittaci</i> , <i>Cp. pneumoniae</i> + <i>C. suis</i>

Nr. 15 war eine Doppelinfektion mit *C. suis* und *C. trachomatis*, wobei die Infektion mit *C. suis* in der IHC mit + und jene mit *C. trachomatis* +++ beurteilt wurde.

Generell sind alle (ausser *C. suis*) infizierten Zellpellets mit +++ immunhistologisch beurteilt worden.

Die schwache Infektion mit *C. suis* und die genetisch hohe Homologie von *C. suis* und *C. trachomatis* könnten somit erklären, warum bei Nr. 15 nur *C. trachomatis* auf dem AT erschien.

Bei Nr. 22 sah man auf dem Chip jede einzelne der 5 Spezies mit welchen das Zellpellet infiziert wurde (siehe Abb. 15 (60. Bild) und 16 (QSV_2-Balkendiagramm))

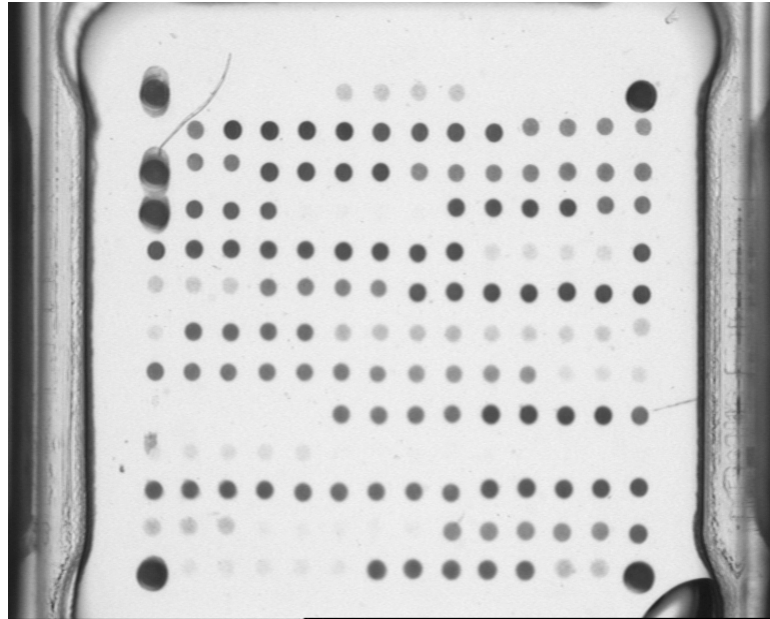


Abbildung 15: Zellpellet ZPA II (60. Bild).

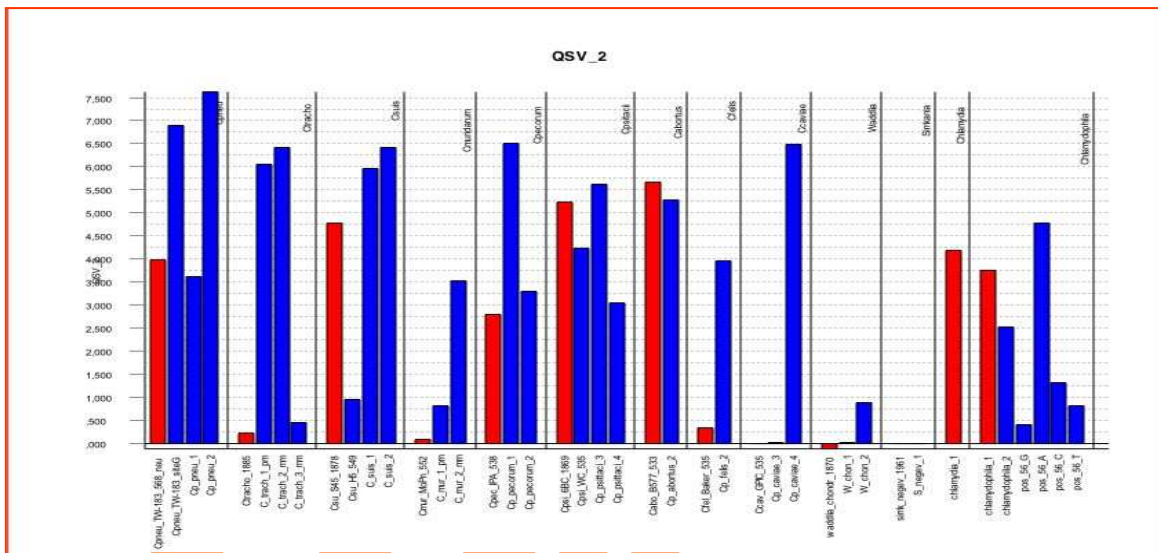


Abbildung 16: QSV_2-Balkendiagramm (rot unterstrichen sind die Spezies mit denen das ZPA II infiziert wurde: alle Balken einer Spezies erscheinen deutlich)

Tab. 13: **Experimentell infizierte Zellkulturen** (aus dem Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit in Jena) (n = 26)

Nr.	Proben ID	Herkunft	ompA PCR	16S PCR	AT-Test
1	DE 0249/6550	Zellkultur, infiziert mit Kot von Hähnen	<i>Cp. psittaci</i>		<i>Cp. psittaci</i>
2	DE0250/6612-1	Zellkultur, infiziert mit Kot von Hühnern	<i>Cp. psittaci</i>		<i>Cp. psittaci</i>
3	DE0251/6612-2	Zellkultur, infiziert mit Kot von Hühnern	<i>Cp. psittaci</i>		<i>Cp. psittaci</i>
4	DE0255/6612-5	Zellkultur, infiziert mit Kot von Hähnen	<i>Cp. psittaci</i>		<i>Cp. psittaci</i>
5	DE0256/6612-6	Zellkultur, infiziert mit Kot von Hühnern	<i>Cp. psittaci</i>		<i>Cp. psittaci</i>
6	DE0257/6612-7	Zellkultur, infiziert mit Kot von Hühnern	<i>Cp. psittaci</i>		<i>Cp. psittaci</i>
7	DE0262/6618	Zellkultur, infiziert mit Kot eines Hühnerbestandes	<i>Cp. psittaci</i>		<i>Cp. psittaci</i>
8	DE0263/6621	Zellkultur, infiziert mit Kot eines Hühnerbestandes	<i>Cp. psittaci</i>		<i>Cp. psittaci</i>
9	3A C1395/1-1	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
10	4A C124/1-1	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
11	5A C1229/1-4	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
12	8A C1264/3-2	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
13	12A C1330/1-2	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
14	15A C172/1-3	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
15	16A C172/2-3	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
16	17A C194/10-3	Zellkultur, infiziert mit Kot vom Rind		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
17	21A C1181/1-2	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
18	23A C1191/1-3	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
19	24A C1199/1-4	Zellkultur, infiziert mit Kot vom Rind		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
20	29A C1207/4-3	Zellkultur, infiziert mit Kot vom Schwein		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
21	30A C1207/5-3	Zellkultur, infiziert mit Kot vom Schwein		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
22	31A C1208/1-3	Zellkultur, infiziert mit Kot vom Rind		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
23	34A C1221/2-2	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
24	37A C1220/1-3	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
25	41A C1259/1-3	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. psittaci</i>	<i>Cp. psittaci</i>
26	42A C1273/1-2	Zellkultur, infiziert mit Kot von Vögeln		<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>

Sämtliche Experimente zeigten auf dem AT das erwartete Resultat, alle 26 Proben sind richtig erkannt worden (Sensitivität und Spezifität in diesem Fall = 1).

3. Resultate Frischmaterial: Tupfer und Milchproben (n = 141)

Tab. 14a: **Augentupfer von Meerschweinchen (Ms) mit und ohne Erkrankung (Konjunktivitis) und der Linsenflüssigkeit des Besitzers (Ls) (n = 26)**

Bei diesem Experiment wurde in 8 Proben *Cp. caviae* gefunden. Diese stammen von einer Meerschweinchenherde aus der Schweiz aus dem Jahre 2004 (Lutz-Wohlgroth et al., 2006). Die Untersuchung mit der Real-time PCR und dem AT-Test der Augentupfer und der Linsenflüssigkeit des Besitzers der Tiere, welcher von Keratitis und Konjunktivitis berichtete, oder gesunde Meerschweinchen, die im gleichen Gehege waren wie die Erkrankten, blieben negativ im Bezug auf *Chlamydiaceae* sp.. Weitere Tests mit der 16S PCR ergaben ein positives Resultat auf *Parachlamydia acanthamoebae*. Die Bedeutung dieser Entdeckung ist noch unklar und muss weiteren Untersuchungen unterliegen.

Nr.	Proben ID	Herkunft	Real-time PCR <i>Chlamydiaceae</i> (C _t)	16S PCR	IGS-L PCR	AT-Test
1	MS-1b	Augentupfer eines erkrankten Ms	20.8	<i>Cp. caviae</i>	<i>Cp. caviae</i>	<i>Cp. caviae</i>
2	MS-3re	Augentupfer eines erkrankten Ms	>45	<i>Parachlamydia</i> sp.	negativ	kein Signal
3	MS-9re	Augentupfer eines erkrankten Ms	>45	uncult. Chlam.	negativ	kein Signal
4	MS-10re	Augentupfer eines erkrankten Ms	>45	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	negativ	kein Signal
5	MS-15re	Augentupfer eines erkrankten Ms	>45	uncult. Chlam.	negativ	<i>Cp. caviae</i>
6	MS-16li	Augentupfer eines erkrankten Ms	22.8	<i>Cp. caviae</i>	<i>Cp. caviae</i>	<i>Cp. caviae</i>
7	MS-18re	Augentupfer eines erkrankten Ms	30.2	<i>Cp. caviae</i>	<i>Cp. caviae</i>	<i>Cp. caviae</i>
8	MS-25re	Augentupfer eines erkrankten Ms	36.9	uncult. Chlam.	negativ	<i>Cp. caviae</i>
9	MS-27re	Augentupfer eines erkrankten Ms	22.3	<i>Cp. caviae</i>	<i>Cp. caviae</i>	<i>Cp. caviae</i>
10	MS-29re	Augentupfer eines erkrankten Ms	35.9	<i>Cp. caviae</i>	negativ	<i>Cp. caviae</i>
11	MS-31re	Augentupfer eines erkrankten Ms	37.0	<i>Cp. caviae</i>	negativ	<i>Cp. caviae</i>
12	MS-40re	Augentupfer eines erkrankten Ms	>45	uncult. Chlam.	negativ	kein Signal
13	MS-42li	Augentupfer eines erkrankten Ms	>45	<i>Parachlamydia Halli</i> coccus	negativ	kein Signal
14	MS-43re	Augentupfer eines erkrankten Ms	>45	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	negativ	kein Signal
15	MS-44re	Augentupfer eines gesunden Ms	>45	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	negativ	kein Signal
16	MS-78re	Augentupfer eines gesunden Ms	>45	<i>Cp. psittaci</i>	negativ	kein Signal
17	MS-84re	Augentupfer eines erkrankten Ms	>45	negativ	negativ	kein Signal
18	MS-97li	Augentupfer eines erkrankten Ms	>45	negativ	negativ	kein Signal
19	MS-100re	Augentupfer eines gesunden Ms	>45	negativ	negativ	kein Signal
20	MS-106re	Augentupfer eines gesunden Ms	>45	negativ	negativ	kein Signal
21	MS-115re	Augentupfer eines gesunden Ms	>45	negativ	negativ	kein Signal
22	MS-120re	Augentupfer eines gesunden Ms	>45	negativ	negativ	kein Signal
23	MN-3Kli	linke Ls des Besitzers	>45	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	negativ	kein Signal
24	MN-3Kre	rechte Ls des Besitzers	>45	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	negativ	kein Signal
25	MN-3Tli	Augentupfer vom linken Auge des Besitzers	>45	uncult. Chlam.	negativ	kein Signal
26	MN-3Tre	Augentupfer vom rechten Auge des Besitzers	>45	uncult. Chlam.	negativ	kein Signal

Nr. 1-14 und 17 und 18 waren an Konjunktivitis erkrankte Meerschweinchen. Die restlichen Tiere zeigten keine Symptome, deren Besitzer ebenfalls nicht.

Nr.1, 6 und 7, und 9 zeigten bei allen Tests inklusive AT das erwartete positive Resultat an, nämlich *Cp. caviae*.

Nr. 5 zeigte nur beim AT-Test *Cp. caviae*, die Real-time-PCR und IGS-L blieben negativ, bei der 16S PCR wurden uncultured Chlamydiales entdeckt.

Bei Nr. 8 war die Real-time-PCR positiv für *Chlamydiaceae*, deshalb darf man dem AT-Resultat (*Cp. caviae*) durchaus Glauben schenken.

Bei den Nummern 12-14 und 17+18 war die Real-time-PCR negativ (Ct über 45). Es handelte sich um an Konjunktivitis erkrankte Meerschweinchen, welche mit grosser Wahrscheinlichkeit an einem anderen Infektionserreger als Chlamydien litten.

Bei Nr. 16, einem gesunden Meerschweinchen, wurde in der 16S PCR *Cp. psittaci* gefunden. Da die Real-time PCR negativ war handelte es sich beim 16S PCR Resultat möglicherweise um eine Kontamination.

Alle anderen Augentupfer der gesunden Meerschweinchen und der Linsenflüssigkeit deren Besitzer sind in allen Referenzmethoden ausser der 16S (*Parachlamydia acanthamoebae* (Nr. 13-15, 23+24) oder uncultured Chlamydiales (Nr. 3, 12, 25+26) negativ.

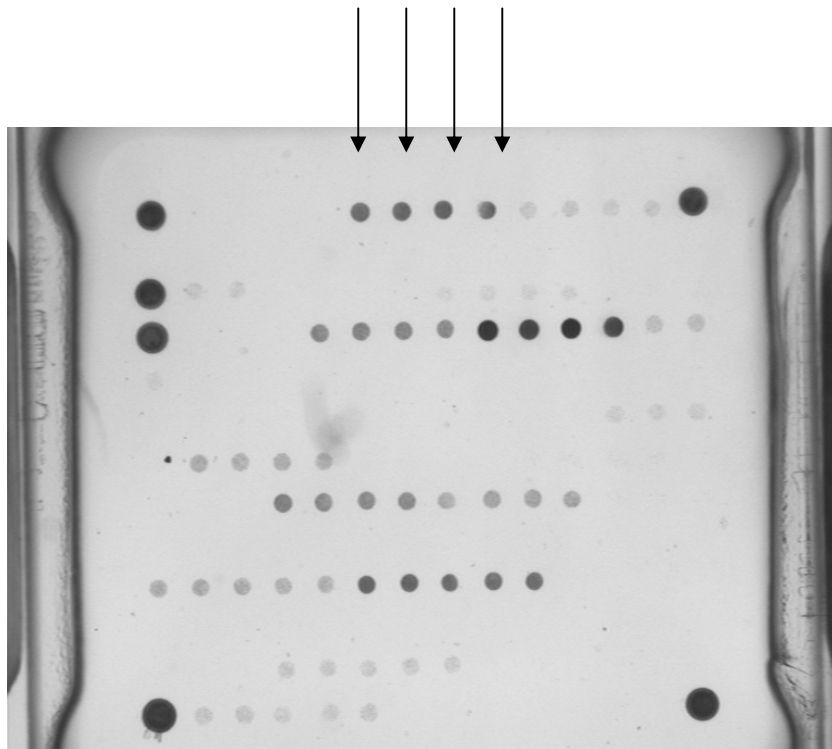


Abbildung 17: Augentupfer von Meerschweinchen Nr. 5 (Ms-15re). Der Chip zeigte die *Cp. caviae*-Sonden und die W_chon_2-Sonden erschienen ebenfalls (Pfeile).

Tab. 14b: Proben von Menschen und Vögeln aus einem Psittakose-Ausbruch (aus dem Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit in Jena) (n = 13)

Tabelle 14b zeigt Resultate von 13 Proben, 6 davon stammen vom Menschen. Der DNA Mikroarray zeigte das Vorhandensein von *Cp. psittaci* in 6 Proben einer infizierten Hühnerherde und zwei einer ernsthaft an Chlamydiose erkrankten Kontaktperson (Patient K), sämtliche Tiere und Menschen befanden sich zum Zeitpunkt des Ausbruches in Deutschland. Proben von zwei anderen Personen, einer von ihnen mit Symptomen und *Cp. psittaci*-positiv getestet (Patient R), wurden als Verdachtsfälle von weiteren Ausbrüchen eingesendet. Interessanterweise war Nr. 13 mit der Real-time PCR positiv getestet worden, aber zeigte auf dem Chip ein atypisches Hybridisationsmuster, nämlich nur die genus-spezifische *Chlamydophila*-Sonde, aber kein spezies-spezifisches Signal. Die Sequenzierung des Produktes der ompA PCR (ompA Gen) ergab eine 88% Homologie zu einem unspezifischen Vogel-Stamm von *Chlamydophila*, dem nächsten Verwandten, aber keine Homologie zu den heute bekannten und definierten Spezies der *Chlamydiaceae*.

Nr.	Proben ID	Herkunft	Real-time PCR <i>Chlamydiaceae</i> (C _t)	AT-Test
1	G0175-05	Patient K, Bronchioalveolarlavage	40,6	<i>Cp. psittaci</i>
2	G0174-05	Patient K, Urin	43	<i>Cp. psittaci</i>
3	G0222-05	Patient K, Urin (11 Tage später)	>45	Kein Signal
4	G0223-05	Patient R, Bronchioalveolarlavage	38,9	<i>Cp. psittaci</i>
5	G0202-05	Patient F, Pharynx tupfer	38,7	<i>Cp. psittaci</i>
6	G0022-05	Patient H, Lymphgewebe	>45	Kein Signal
7	B/06730-T5	erkrankter Hahn, Kloakentupfer	36,9	<i>Cp. psittaci</i>
8	B/06687-T2	erkrankter Hahn, Nasenschleimhaut	34,5	<i>Cp. psittaci</i>
9	B/06687-T6	erkrankter Hahn, Kloakentupfer	36	<i>Cp. psittaci</i>
10	B/06687-T10	erkrankter Hühnerbestand, Kotproben	37,3	<i>Cp. psittaci</i>
11	B/06688-T2	erkranktes Huhn, Kloakentupfer	27,4	<i>Cp. psittaci</i>
12	B/06688-T4	erkranktes Huhn, Kloakentupfer	23,3	<i>Cp. psittaci</i>
13	6617-T6	gesundes Huhn, Kloakentupfer	29,5	<i>Chlamydophila spp.</i>

Tab. 15: Augentupferproben von gesunden und an Konjunktivitis erkrankten Schafen (n = 22)

Die Untersuchung von 22 Augentupfern von Schafen ergab in 5 Fällen ein positives Resultat beim AT auf *Cp. abortus* und in 4 Fällen auf *C. suis*. Die letzteren wurden mit der 16S bestätigt, und es besteht die Möglichkeit dass dieses Resultat auf den nahen Kontakt von Schweinen und Schafen in diesem Betrieb zurückzuführen ist. Bei dieser Gruppe von Proben bestand keine Konkordanz zwischen den verschiedenen Tests. So waren 5/22 (22.7%) nur in der Real-time PCR positiv nicht aber im AT, und 1 Probe (4.5%) war nur im AT positiv, in der Real-time PCR aber negativ.

Nr.	Proben ID	Herkunft	Real-time PCR <i>Chlamydiaceae</i> (C ₁)	16S PCR	IGS-L	AT-Test
1	Sf-1a	Augentupfer eines gesunden Sf	>45	<i>uncult. Chlamydiales</i>	negativ	kein Signal
2	Sf-2a	Augentupfer eines gesunden Sf	>45	<i>uncult. Chlamydiales</i>	negativ	kein Signal
3	Sf-6 IF	Augentupfer eines erkrankten Sf	36.3	<i>C. suis</i> R22	negativ	kein Signal
4	Sf-7 KC	Augentupfer eines erkrankten Sf	34.6	<i>C. suis</i> R22	<i>C. suis</i>	<i>C. suis</i>
5	Sf-8 IB	Augentupfer eines erkrankten Sf	34.9	<i>C. suis</i> R22	negativ	kein Signal
6	Sf-9 HS	Augentupfer eines erkrankten Sf	32.1	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>
7	Sf-12 IT	Augentupfer eines erkrankten Sf	36.4	<i>Cp. pecorum</i>	negativ	kein Signal
8	Sf-15 IN	Augentupfer eines erkrankten Sf	37.2	<i>Cp. abortus</i>	negativ	kein Signal
9	Sf-19 7418	Augentupfer eines erkrankten Sf	>45	<i>Cp. caviae</i>	negativ	kein Signal
10	Sf-22 IZ	Augentupfer eines erkrankten Sf	35.2	<i>C. suis</i>	<i>C. suis</i>	<i>C. suis</i>
11	Sf-24 IS	Augentupfer eines erkrankten Sf	35.0	<i>C. suis</i>	<i>C. suis</i>	<i>C. suis</i>
12	Sf-30 HN	Augentupfer eines erkrankten Sf	>45	negativ	<i>C. suis</i>	<i>C. suis</i>
13	Sf-53	Augentupfer eines gesunden Sf	>45	negativ	negativ	kein Signal
14	Sf-54	Augentupfer eines gesunden Sf	>45	<i>Uncult. Chlam./Endosy.</i>	negativ	kein Signal
15	Sf-55	Augentupfer eines erkrankten Sf	>45	<i>Candidatus rhabdochlamydia</i>	negativ	kein Signal
16	Sf-62	Augentupfer eines erkrankten Sf	>45	negativ	negativ	kein Signal
17	Sf-91	Augentupfer eines erkrankten Sf	>45	negativ	negativ	kein Signal
18	Sf-112	Augentupfer eines gesunden Sf	33.9	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>
19	Sf-113	Augentupfer eines gesunden Sf	31.1	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>
20	Sf-115	Augentupfer eines gesunden Sf	36.2	<i>uncult. clinical Neochlam.</i>	<i>Cp. abortus</i>	kein Signal
21	Sf-128	Augentupfer eines erkrankten Sf	31.6	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>
22	Sf-129	Augentupfer eines erkrankten Sf	33.6	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>	<i>Cp. abortus</i>

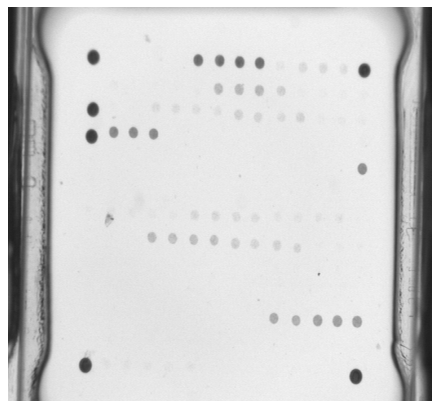


Abbildung 18: 60. Bild der Probe Nr. 18 (Sf-112): *Cp. abortus* (Die W_chon_2-Sonde erscheint ebenfalls)

Nr. 3-12, 15-17 und 21-22 (n = 15) zeigten klinisch Konjunktivitis.

Nr. 3, 5, 7 und 8 (n = 4) waren sowohl in der Real-time-PCR als auch in der 16S-PCR positiv, in der IGS-L (weniger sensitiv als die anderen beiden PCR-Methoden) und im AT jedoch negativ, respektiv zeigten kein Signal.

Nr. 4, 6, 10-11 und 18-19 (symptomlose Träger), und 21-22 (n = 8) sind Chlamydien-Infektionen die als solche mit sämtlichen Methoden richtig erkannt wurden.

Nr. 9 und 15-17 (n = 4) sind an Konjunktivitis erkrankte Schafe, die einen anderen Infektionserreger beherbergen (nicht Chlamydien).

Nr. 1-2 und 13-14 (n = 4) sind gesunde Schafe ohne Infektion.

Nr. 20 wurde nur mit der Real-time-PCR und der IGS-L PCR als Infektion mit *Cp. abortus* detektiert, auch hier handelte es sich um ein symptomloses Trägertum. Bei der 16S PCR wurden *uncultured clinical Neochlamydiales* gefunden.

Bei Nr. 4, 10 und 11 wurde mit allen Untersuchungsmethoden *C. suis* entdeckt. Das Schaf ist nicht der typische Wirt von *C. suis*. Dieses Resultat bedarf weiteren Untersuchungen.

Tab. 16: Nasen- und Augentupfer von Kälbern aus einer Herde mit Erkrankungen am Respirationstrakt (aus dem Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit in Jena) (n = 59)

Bei 37 Nasentupfern von Kälbern identifizierte der AT *Cp. pecorum* (n = 9), *Cp. abortus* (n = 5) und beide (*Cp. abortus* und *Cp. pecorum*) im Sinne einer Mischinfektion (n = 9) und *Cp. psittaci* (n = 1). Bei den Augentupfern entnommen aus derselben Herde waren n = 10 mit *Cp. pecorum* infiziert, 2 waren *Cp. abortus* positiv und 7 positiv auf beide Chlamydienpezies. Bei 15 Proben war nur die Real-time PCR positiv und der AT zeigte kein Signal.

Nr.	Proben ID	Herkunft	Real-time PCR <i>Chlamydiaceae</i> (C _t)	AT-Test
1	H143A	Kalb, Augentupfer	31.9	<i>Cp. pecorum</i>
2	H144A	Kalb, Augentupfer	29.1	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
3	H145N	Kalb, Nasentupfer	30.7	Kein Signal
4	H101N	Kalb, Nasentupfer	33.3	<i>Cp. pecorum</i>
5	A28A	Kalb, Augentupfer	31.3	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
6	A109N	Kalb, Nasentupfer	34.5	<i>Cp. abortus</i>
7	A120N	Kalb, Nasentupfer	35.1	<i>Cp. pecorum</i>
8	A119A	Kalb, Augentupfer	37.3	<i>Cp. pecorum</i>
9	W66N	Kalb, Nasentupfer	33.6	Kein Signal
10	W36N	Kalb, Nasentupfer	37.8	<i>Cp. psittaci</i>
11	W40A	Kalb, Augentupfer	36.3	<i>Cp. pecorum</i>
12	W46A	Kalb, Augentupfer	37.4	<i>Cp. pecorum</i>
13	W114A	Kalb, Augentupfer	25.3	<i>Cp. pecorum</i>
14	W115A	Kalb, Augentupfer	26.2	<i>Cp. pecorum</i>
15	H257N	Kalb, Nasentupfer	37.9	<i>Cp. pecorum</i>
16	H266N	Kalb, Nasentupfer	38.9	<i>Cp. pecorum</i>
17	H271N	Kalb, Nasentupfer	42.2	Kein Signal
18	A181N	Kalb, Nasentupfer	42.5	Kein Signal
19	A209N	Kalb, Nasentupfer	36.2	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
20	A272N	Kalb, Nasentupfer	37	<i>Cp. pecorum</i>
21	A280N	Kalb, Nasentupfer	38.5	<i>Cp. pecorum</i>
22	A282N	Kalb, Nasentupfer	36	kein Signal
23	A283N	Kalb, Nasentupfer	35.6	<i>Cp. abortus</i>
24	A227A	Kalb, Augentupfer	41.4	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
25	A177A	Kalb, Augentupfer	>45	<i>Cp. pecorum</i>
26	A177N	Kalb, Nasentupfer	39.5	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
27	A209A	Kalb, Augentupfer	35.4	<i>Cp. pecorum</i>
28	A227N	Kalb, Nasentupfer	38.4	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
29	A251A	Kalb, Augentupfer	32.6	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
30	A280A	Kalb, Augentupfer	>45	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
31	A282A	Kalb, Augentupfer	23.3	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
32	A283N	Kalb, Nasentupfer	35.6	<i>Cp. abortus</i>
33	A288N	Kalb, Nasentupfer	>45	Kein Signal
34	H290N	Kalb, Nasentupfer	36.1	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
35	W168A	Kalb, Augentupfer	35.6	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
36	W171A	Kalb, Augentupfer	34.9	kein Signal
37	H288N	Kalb, Nasentupfer	35.9	<i>Cp. abortus</i>
38	H186A	Kalb, Augentupfer	40.9	kein Signal
39	H192A	Kalb, Augentupfer	33.6	<i>Cp. pecorum</i>
40	H309A	Kalb, Augentupfer	41.6	<i>Cp. abortus</i>
41	A296A	Kalb, Augentupfer	29.6	<i>Cp. pecorum</i>
42	A329N	Kalb, Nasentupfer	38.9	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
43	H309N	Kalb, Nasentupfer	36.4	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
44	H310N	Kalb, Nasentupfer	36.8	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
45	H313N	Kalb, Nasentupfer	30.1	<i>Cp. pecorum</i>
46	H315N	Kalb, Nasentupfer	32.2	<i>Cp. pecorum</i>
47	H321N	Kalb, Nasentupfer	43.9	kein Signal
48	H329N	Kalb, Nasentupfer	38.5	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
49	H332N	Kalb, Nasentupfer	37.2	kein Signal
50	W185N	Kalb, Nasentupfer	44.3	kein Signal
51	W194N	Kalb, Nasentupfer	43.7	kein Signal
52	W197N	Kalb, Nasentupfer	43.9	kein Signal
53	W211N	Kalb, Nasentupfer	40.8	kein Signal
54	A303A	Kalb, Augentupfer	39.8	kein Signal
55	A324A	Kalb, Augentupfer	40.7	<i>Cp. abortus</i>
56	A304N	Kalb, Nasentupfer	38.1	<i>Cp. Abortus</i> + <i>Cp. pecorum</i>
57	A307N	Kalb, Nasentupfer	>45	<i>Cp. pecorum</i>
58	A319N	Kalb, Nasentupfer	40.9	<i>Cp. abortus</i>
59	A320N	Kalb, Nasentupfer	43.2	kein Signal

Tab. 17: Frische Milchproben aus einem auf Chlamydien überwachten Kuhbestand (aus dem Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit in Jena) (n = 21)

Eine Kuhherde mit Milchqualitätsmängel (erhöhte Zellzahlen) und sporadischen Aborten wurde untersucht. Es handelte sich um 21 Proben. 12 Proben, die bei der Real-time PCR positiv auf Chlamydien waren, zeigten auch auf dem AT ein positives Resultat und 5 Proben waren bei beiden Tests negativ. 3 Proben waren bei der Real-time PCR positiv aber negativ beim AT (14.3%) und eine Probe (4.8%) war nur positiv im AT. Der am häufigsten gefundene Keim war *Cp. abortus* (n = 10) während 2 Milchproben (Nr. 4 und 18) sowohl *Cp. abortus* als auch *Cp. psittaci* enthielten.

Nr.	Proben ID	Herkunft	Real-time PCR <i>Chlamydiaceae</i> (C _t)	AT-Test
1	T46M	Milchprobe einer gesunden Kuh	39.2	<i>Cp. abortus</i>
2	T47M	Milchprobe einer gesunden Kuh	38.2	<i>Cp. abortus</i>
3	T48M	Milchprobe einer gesunden Kuh	41.0	<i>Cp. abortus</i>
4	T49M	Milchprobe einer gesunden Kuh	38.5	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. psittaci</i>
5	T50M	Milchprobe einer gesunden Kuh	39.2	<i>Cp. abortus</i>
6	T51M	Milchprobe einer gesunden Kuh	37.6	<i>Cp. abortus</i>
7	T52M	Milchprobe einer gesunden Kuh	39.6	<i>Cp. abortus</i>
8	T53M	Milchprobe einer gesunden Kuh	38.8	<i>Cp. abortus</i>
9	T54M	Milchprobe einer gesunden Kuh	39.5	kein Signal
10	T91M	Milchprobe einer gesunden Kuh	>45	kein Signal
11	T92M	Milchprobe einer gesunden Kuh	>45	kein Signal
12	T93M	Milchprobe einer gesunden Kuh	>45	kein Signal
13	T94M	Milchprobe einer gesunden Kuh	40.7	kein Signal
14	T95M	Milchprobe einer gesunden Kuh	>45	<i>Cp. abortus</i>
15	T97M	Milchprobe einer gesunden Kuh	39.7	<i>Cp. abortus</i>
16	T98M	Milchprobe einer gesunden Kuh	40.5	<i>Cp. abortus</i>
17	T99M	Milchprobe einer gesunden Kuh	>45	kein Signal
18	T100M	Milchprobe einer gesunden Kuh	40.2	<i>Cp. abortus</i> + <i>Cp. psittaci</i>
19	T101M	Milchprobe einer gesunden Kuh	40.3	kein Signal
20	T102M	Milchprobe einer gesunden Kuh	>45	kein Signal
21	M002	Milchprobe einer Kuh die abortiert hatte	37.8	<i>Cp. psittaci</i>

4. Resultate Bakterienstämme (n = 47)

Um die Spezifität des Systems zu zeigen wurden 46 verschiedene nicht-chlamydiale Bakterien-spezies und *Candida spp.* untersucht, indem 100 ng DNA Aliquots in Wasser nach der Biotin PCR hybridisiert wurden.

Fast alle Bakterien ergaben kein Hybridisierungssignal, ausser *Salmonella enteritidis*, *Mycobacteria avium* und *intracellulare*, und *Pseudomonas aeruginosa*, alle reagierten leicht mit der Genus-spezifischen Sonde Chlamydia_1. Zusätzlich reagierte *S. enteritidis* leicht mit der Cp_abortus_2-Sonde. Da die Signale nur auf eine und keine Spezies-spezifische Sonde der Chlamydien reagierten, war keine der Proben falsch positiv. Die Spezifität lag demnach bei diesem Test bei 1.

Tab. 18: **verschiedene Bakterienstämme** (aus dem Institut für Lebensmittelhygiene, Zürich und dem Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit in Jena) (n = 47)

Nr.	Mikrobiologische Spezies	AT-Test
1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061 (Jena)	Kein Signal
2	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 13061 (Zürich)	Kein Signal
3	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Kein Signal
4	<i>Brachyspira innocens</i> B256	Kein Signal
5	<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416	Kein Signal
6	<i>Burkholderia fungorum</i> A157	Kein Signal
7	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	Kein Signal
8	<i>Burkholderia pseudomallei</i> ATCC 23343	Kein Signal
9	<i>Campylobacter coli</i> BS114/05	Kein Signal
10	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> BS101/05	Kein Signal
11	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> BS100/05	Kein Signal
12	<i>Campylobacter hyointestinalis</i> BS102/05	Kein Signal
13	<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC4688	Kein Signal
14	<i>Clostridium carnis</i> ATCC 25777	Kein Signal
15	<i>Clostridium chauvoei</i> ATCC 10092	Kein Signal
16	<i>Clostridium perfringens</i> 235/90	Kein Signal
17	<i>Clostridium perfringens</i> type B	Kein Signal
18	<i>Clostridium septicum</i> ATCC 12464	Kein Signal
19	<i>Coxiella burnetii</i> SH6	Kein Signal
20	<i>Enterobacter cloacae</i> 5/93	Kein Signal
21	<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC 51329	Kein Signal
22	<i>Enterococcus faecium</i> DSM 2918	Kein Signal
23	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Kein Signal
24	<i>Gallibacterium anatis</i> Ge160	Kein Signal
25	<i>Gallibacterium genomospecies</i> Ge81	Kein Signal
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (wild strain)	Kein Signal
27	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 13651	Kein Signal
28	<i>Listeria monocytogenes</i> (wild strain)	Kein Signal
29	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Kein Signal
30	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>avium</i> ATCC 19421	NI=0.53 (Sonde: chlamydia_1)
31	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i> ATCC 1698	NI=0.24 (Sonde: chlamydia_1)
32	<i>Mycobacterium bovis</i> 99A1119	Kein Signal
33	<i>Mycobacterium intracellulare</i> DSM 43223	NI=0.59 (Sonde: chlamydia_1)
34	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC PG1	Kein Signal
35	<i>Pasteurella multocida</i> 383	Kein Signal
36	<i>Proteus mirabilis</i> DSM 788	Kein Signal
37	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	NI=0.38 (Sonde: chlamydia_1)
38	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	Kein Signal
39	<i>Candida spp.</i> (wild strain)	Kein Signal
40	<i>Salmonella Enteritidis</i> (wild strain)	NI=0.50 (Sonde: chlamydia_1), NI=0.39 (Sonde: Cp_abortus_2)
41	<i>Salmonella Saintpaul</i> 228/93	Kein Signal
42	<i>Shigella sonnei</i> ATCC 29930	Kein Signal
43	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Kein Signal
44	<i>Staphylococcus aureus</i> St 67	Kein Signal
45	<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 33019	Kein Signal
46	<i>Streptococcus agalactiae</i> E 12463	Kein Signal
47	<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3	Kein Signal

Die Cp_abortus_2-Sonde trat einzeln auf, was bei einer *Cp. abortus* enthaltenden Probe nie aufgetaucht wäre. Die gefundene DNA war also nicht *Cp. abortus* und auch keine andere bekannte *Chlamydia* oder *Chlamydophila*-Spezies. Die Hybridisierung könnte wieder mit der hohen Homologie hochkonservierter DNA-Abschnitte in der 23S-Gen-Region zwischen den *Chlamydiaceae* und anderen gram-negativen Bakterien zusammenhängen.

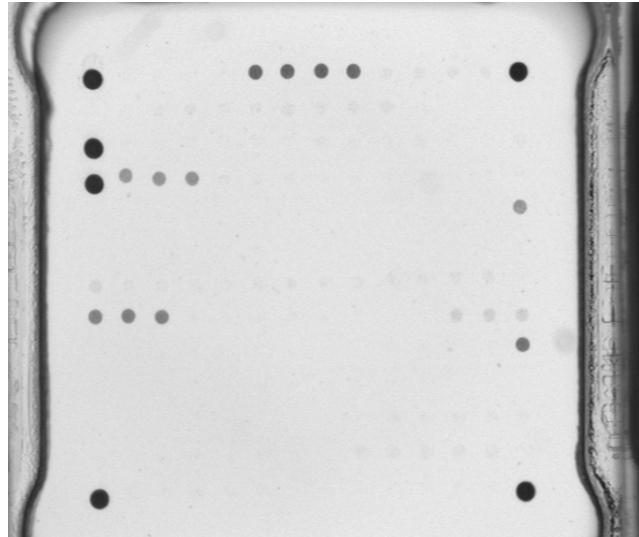


Abbildung 19: Nr. 40 (*Salmonella enteritidis* wild strain)

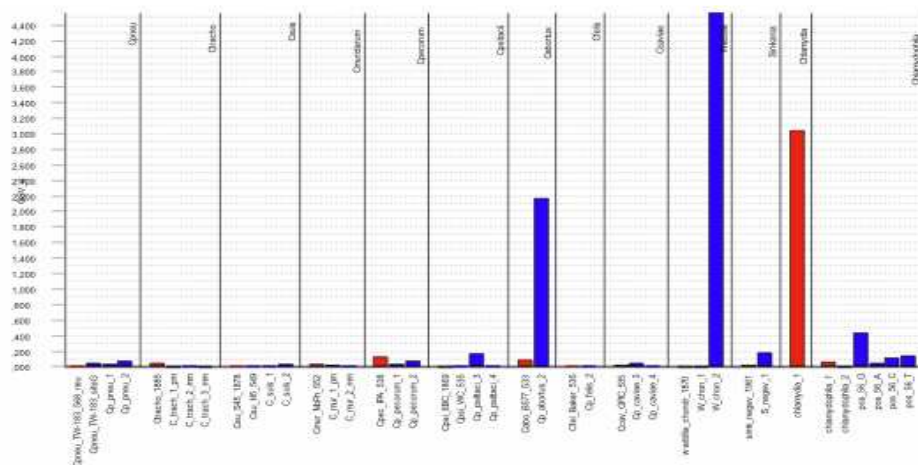


Abbildung 20: QSV_2-Werte Balkendiagramm von Nr. 40 (nur einzeln stehende Balken sind sichtbar)

5. Resultate Verdünnungsreihen

Um die Sensitivität des AT-Systems im Vergleich zur 16S-, IGS-S- und IGS-L-PCR zu testen wurden Verdünnungsreihen mit *Cp. abortus* in Wasser (Tab. 19, mit und ohne DNA-Extraktion) und verschiedenen Ejakulaten (Tab. 20, Eber und Stier) untersucht.

Tab. 19: ***Cp. abortus*-DNA in H₂O: Verdünnungsreihen (mit und ohne DNA-Extraktion)**

	Detektionslimit (Templates/μl)			
	IGS-L-PCR	IGS-S-PCR	16S-PCR	AT
mit DNA-Extraktion	100	10	10	10
ohne DNA-Extraktion	100	10	1	10

Bei einer höchst möglichen Verdünnung (ein einziges Template pro Mikroliter Wasser, ohne DNA-Extraktionsverfahren) ist die 16S-PCR im Vergleich zu den anderen (IGS-L, IGS-S und AT-System) noch in der Lage dieses zu erfassen.

Die IGS-L ist die am wenigsten sensitive Methode und kann nur bis zu 100 Templates pro Mikroliter Wasser detektieren, sowohl mit als auch ohne DNA-Extraktion.

Die IGS-S ist mit 10 Templates pro Mikroliter Wasser gleich sensitiv wie das AT-System.

Alle Ansätze wurden mindestens dreimal wiederholt und zeigten immer das gleiche Resultat.

In die Untersuchung miteinbezogen wurden auch Ejakulate vom Stier (S, Normospermie) und Eber (E, Normospermie und Azoospermie). Die Detektionslimiten sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 20: **Stier- und Eberejakulate: Verdünnungsreihen (*Cp. abortus*-DNA in Ejakulaten verdünnt)**

	Detektionslimit (Templates/μl)			
	IGS-L-PCR	IGS-S-PCR	16S-PCR	AT
E: Azoospermie	100	10	10	10
E: Normospermie	100	10	10	10
S: Normospermie	100	10	10	10

Die Sensitivität des AT-Systems, der 16S-PCR und der IGS-S-PCR liegen im selben Bereich, bei einem Detektionslimit von 10 Templates/μl. Bei der IGS-L-PCR wurde nur bis 100 Templates/μl detektiert.

6. Statistische Auswertungen

Die Sensitivitäten und ihre 95% Wahrscheinlichkeits-Intervalle sind in Tabelle 22 wiedergegeben. Der AT-Test erreichte eine mittlere Sensitivität von 81% (76-86%). Dies war vergleichbar mit dem Resultat der 16S PCR (84% (75-92%)) und der Real-time PCR (90% (83-96%)). Die Immunhistochemie mit 57% (41-71%) war weniger sensitiv, ebenso die IGS-L (53% (34-73%)).

Folgende Tabelle (Tab. 21) zeigt welche verschiedenen Referenztests bei welcher Anzahl Proben durchgeführt wurden:

Tab. 21: Anzahl Proben im Bezug auf Test-Kombinationen

Test Kombination	Anzahl Proben
AT-Test, Real-time PCR, 16S PCR, und IGS-L PCR	48
AT-Test und Real-time PCR	97
AT-Test, 16S PCR, IGS-L PCR, und Immunohistochemie	25
AT-Test und 16S PCR	35
AT-Test, Immunohistochemie und 16S PCR	39
AT-Test und Immunohistochemie	1
AT-Test und nested <i>ompA</i> PCR	8
Nur AT-Test (experimentell infizierte gnotobiotische Ferkel und Zellkulturen)	40

Tab. 22: Mediane und 95% Wahrscheinlichkeitsintervalle der verschiedenen Tests

Test	Sensitivität	Spezifität*
AT-Test	0.81 (0.76-0.86)	1
Real-time PCR	0.90 (0.83-0.96)	1
16S PCR	0.84 (0.75-0.92)	1
<i>ompA</i> PCR	0.90 (0.66-1)	1
IGS-L PCR	0.53 (0.34-0.73)	1
IGS-S PCR	0.91 (0.70-1)	1
Immunohistochemie	0.57 (0.41-0.71)	0.96 (0.86-1)

* Bei den DNA-Testverfahren wird eine Spezifität von 1 angenommen.

VI Diskussion

Eine schnelle und genaue Diagnose von Chlamydiosen bei Tieren ist nicht nur für Einzeltiere oder einzelne Herden von enormer Wichtigkeit, sondern spielt auch für den Menschen eine grosse Rolle, wenn es sich wie hier teilweise um Zoonosen handelt. Zum Nachweis von Chlamydien (serologisch, antigenetisch oder genomisch) gibt es bis heute eine grosse Anzahl von diagnostischen Methoden, wie zum Beispiel die Zellkultur, Antigen- und Antikörper-ELISA's, die konventionelle und die Real-time PCR, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz. Nicht alle diese Tests genügen den Anforderungen bezüglich Sensitivität und Spezifität. In veterinärmedizinischen Laboratorien muss oft von autolytischem oder formalinfixiertem Material ausgegangen werden das keine Möglichkeit mehr bietet lebende Bakterien zu detektieren. Antikörper, die in der Immunhistochemie eingesetzt werden sind oft familien-spezifisch für *Chlamydiaceae* und eine spezies-spezifische Diagnose ist somit nicht möglich. DNA-Testverfahren sind zwar sehr sensitiv, jedoch gibt es bisher keine Untersuchungsmethode die in der Lage ist in einem Schritt alle 9 *Chlamydia* und *Chlamydophila*-Spezies zu identifizieren. Bei der 16S PCR muss aus einem Gel jede positive Bande sequenziert werden, um mit Sicherheit festzustellen, dass es sich um *Chlamydiaceae*-DNA handelt und welche Spezies involviert ist. Dies ist aufwändig und teuer, aber vor allem sehr arbeitsintensiv. Bei diesem Verfahren ist es zusätzlich nicht möglich eine Doppelinfektion zu entdecken.

Ein Vorteil der Real-time PCR besteht in der quantitativen Analyse von DNA, jedoch ist auch hier keine Speziesidentifikation möglich.

Die vorliegenden Daten dieser Untersuchung zeigen, dass ein DNA Mikroarray in vielen verschiedenen Proben, inklusive autolytischem Gewebe (Plazenta), formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe und auch frischem Material wie Tupfer, Milch und Kot verschiedene Chlamydienspezies mit hoher Sensitivität und Spezifität detektieren und identifizieren kann und damit sehr gut zum Einsatz in einem Routinelabor geeignet ist.

Sensitivität und Spezifität des AT variieren je nach Menge der vorhandenen Ziel-DNA.

Die Plazenten von Schafen, welche formalinfixiert und in Paraffin eingebettet waren und mittels anderer diagnostischer Methoden als *Cp. abortus* positiv bestimmt wurden und hohe Antigenmengen enthalten zeigten auch auf dem AT alle das erwartete Resultat. Diese Proben sind zum Teil bis zu 11 Jahre gelagert worden und waren trotzdem positiv (Sensitivität und Spezifität bei 1).

Bei anderen formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben wie die Plazenten der Rinder war die Sensitivität erheblich tiefer (6 von 11 negativ). Eine Erklärung hierfür würde die niedrigere Erregerdichte in der Plazenta des Rindes im Gegensatz zum Schaf liefern.

Organe der Vögel und Reptilien (Tab. 3+4) sind bei einem Chlamydienbefall stark infiziert und wurden mit dem AT in jedem Fall entdeckt. (Sensitivität und Spezifität bei 1).

Das Resultat der Real-time PCR, welche für nicht fixierte Proben als Referenzmethode diente, wurde ab einem Ct-Wert von >45 als negativ gewertet. So war das AT-Resultat der Proben mit Ct-Wert >45 immer negativ mit Ausnahme eines Falles (Tab. 13a, Nr. 5). Bei dieser Ausnahme war die Real-time PCR negativ (Ct-Wert>45), auf dem AT wurde aber *Cp. caviae* angezeigt.

Die AT-Tests, die an den Tupfern durchgeführt wurden, fanden erst ungefähr ein Jahr nach der Untersuchung mit der Real-time PCR statt. Die lange Aufbewahrung einer Probe führt im Allgemeinen zu einer DNA-Degradation. Dies erklärt, weshalb einige Proben mit der Real-time PCR positiv waren aber auf dem Mikroarray negativ blieben. Trotzdem bezogen wir diese Proben in die Studie mit ein, denn sie zeigen ein weiteres Mal, wie wichtig eine schnelle Probenbearbeitung doch ist.

Zur Bestimmung der Spezifität des AT-Systems wurden verschiedene Bakterien untersucht (n = 47). Vier der Proben (8,5%) zeigten auf dem Chip ein Signal. *Mycobacterium bovis* und *avium* spp. *avium* reagierten mit der Chlamydia_1-Sonde. Um mit Sicherheit sagen zu können, dass sich in einer zu untersuchenden Probe *Chlamydiaceae* befinden, müssen zwingend zur Chlamydia_1 oder Chlamydophila_1 und _2-Sonde mehrere andere Sonden bei der gleichen Spezies auftreten. In den vier Fällen trat jedoch jeweils nur eine Sonde auf, das heisst die genannten Resultate waren negativ im Bezug auf *Chlamydiaceae*. Somit lag die Spezifität des AT-Systems bei 1.

Zur Sensitivitätskontrolle des AT wurden Verdünnungsreihen untersucht (Teankum et al., 2004 und 2005). Im Vergleich zur IGS-L-PCR ist der AT sensitiver (IGS-L-PCR detektiert maximal bis 100 t/µl, der AT bis zu 10t/µl), was auch die statistischen Auswertungen bestätigten (IGS-L-PCR: 0,53; AT-Test: 0,81; 16S PCR: 0,84; Real-Time PCR: 0,90).

Die W_chon_2-Sonde trat häufig auf, auch bei den Negativkontrollen die hybridisiert wurden (Negativkontrollen einer Probenreihe, nur Mastermix ohne Template). Die besagten Proben erschienen oft auf den Gelbildern als eine Bande bei ca. 170 bp. Die Sequenzierung der amplifizierten DNA-Abschnitte (Banden im Gel) ergab eine 99% Homologie mit dem 23S ribosomalen Gen von *E. coli*.

Untersucht man nun Feldproben ist es möglich, dass sich im Untersuchungsgut auch andere Bakterien wie beispielsweise *E. coli* befinden. Ein anderer Grund, weshalb die W_chon_2-Sonde in den Negativkontrollen häufig auftrat, war die *E. coli*-DNA in der Polymerase.

Die Polymerase, welche für die PCR benutzt wurde (Taq Gold, Applied Biosystems), wird durch ein Expressionsverfahren aus *E. coli* gewonnen. Die Primer welche für die 23S-PCR (AT-System) benutzt wurden waren in der Lage *E. coli*-DNA zu amplifizieren, sofern noch *E. coli*-DNA-Reste in der Polymerase vorlagen. Wegen der hohen Sensitivität der PCR reicht theoretisch ein einziges DNA-Fragment um eine signifikante Amplifikation zu erreichen, welche man dann auf dem Gel oder allenfalls sogar auf dem Chip als die erwähnte W_chon_2-Sonde sieht.

Die vorliegenden Resultate der AT-Tests bei den Psittakose-Ausbrüchen (Tab.13b), dem formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebe (Tab. 1-10) und den Milchproben (Tab. 16) zeigten wie gut dieser Test für die Diagnostik geeignet ist.

Des Weiteren eignet sich der AT DNA Mikroarray auch hervorragend für Tupferproben, wie dies die Untersuchung bei den Augen- und Nasentupfern bei Kälbern und Schafen (Tab. 15) bewiesen hat. Tupfer werden in der Praxis oft zur Probenentnahme benutzt, jedoch enthalten diese meist sehr wenig infektiöses Bakterienmaterial. Die Ct-Values der Real-time PCR verdeutlichen dies, es sind oft weniger als 100 Chlamydien-Einschlusskörper vorhanden. Dadurch kann auch nur sehr wenig DNA für die Diagnostik gewonnen werden.

Ebenfalls durch die vorliegende Studie konnte das hohe DNA-Detektionslimit des AT-Systems von 10t/µl dargelegt werden.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Daten deutlich, dass dieser DNA Mikroarray zur Detektion und Identifikation von Chlamydien sowohl genügend sensitiv für die Routinediagnostik an klinischen Proben, als auch durch sein Vermögen mehrere Spezies zu identifizieren, seiner hohen Spezifität also, ein zeitsparendes System darstellt. Eine genaue Spezies-Diagnose ist in einem einzigen Arbeitstag möglich. Für die Routinediagnostik ist es vor allem wichtig, dass eine grosse Anzahl Proben in einer kurzen Zeit untersucht werden kann. Das muss kostengünstig und dadurch reproduzierbar sein. Aber am wichtigsten ist, dass das System trotzdem den hohen Anforderungen an Spezifität und Sensitivität genügt, welche bei den heutigen Untersuchungsmethoden verlangt werden. Das ArrayTube-System erfüllt alle diese Punkte und ist somit das Untersuchungsmittel der Wahl für die Routinediagnostik.

Chlamydiosen bei Tieren könnten in Zukunft schnell diagnostiziert werden. Alle 9 relevanten Chlamydienspezies (*Chlamydiaceae*) sind auf dem Chip vertreten. Einige dieser Spezies haben ein

breites Wirtsspektrum, zum Beispiel können Rinder mit *Cp. abortus*, *Cp. pecorum* als auch *Cp. psittaci* infiziert sein, Schafe können *Cp. psittaci* und *Cp. abortus* beherbergen, und Schweine gar *Cp. psittaci*, *C. suis*, *Cp. abortus* und *Cp. pecorum*. Es gibt auch Spezies, die ein engeres Wirtsspektrum haben, wie *C. muridarum* und die potenziell zoonotischen *C. felis* und *Cp. caviae*, für welche es bis heute keine spezifischen Tests an klinischen Proben gibt. Denkbar ist auch die Anwendung des AT in der Humanmedizin bei Chlamydiosen von Menschen. Auch wenn in solchen Fällen in der Regel nur die 3 Spezies *Cp. psittaci*, *Cp. pecorum* und *C. trachomatis* erwartet werden braucht es doch einen spezifischen PCR Test für jede einzelne Spezies. Diese Tests wären am genauesten im Bezug auf die Speziesdiagnose, würden sie parallel oder gar als ein Multiplex-Test ablaufen. Der AT ist auch ein interessantes und viel versprechendes Medium wenn es darum geht, den heutigen Stand der Chlamydienepidemiologie und deren Veränderung nach zu verfolgen.

VII Referenzliste

- Aitken ID (2000): Chlamydial abortion. In: Diseases of Sheep, 3rd ed, Blackwell Science, Oxford, pp 81-86
- Aitken ID (2004): Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis). In: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, 5. Ed, Office International des Epizooties, Paris, France.
- Al-Khalidi SF, Myers KM, Rasooly A, Chizhikov V (2004): Genotyping of *Clostridium Perfringens* toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridisation. Molecular Cell Probes, 18, 359-367.
- Amin JD, Wilsmore AJ (1995): Studies on the early phase of the pathogenesis of ovine enzootic abortion in the non-pregnant ewe. British Veterinary Journal, 151, 141-155.
- Anthony RM, Brown TJ, French GL (2000): Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridisation to an oligonucleotide array. Journal of Clinical Microbiology, 38, 781-788.
- Baker JA (1942): A virus obtained from a pneumonia of cats and its possible relation to the cause of atypical pneumonia in man. Science, 96, 475-476.
- Barany F (1991): Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88, 189-193.
- Barbour A, Amano K, Hackstadt T, Perry L, Caldwell H (1982): *Chlamydia trachomatis* has Penicillin-Binding Proteins but not detectable muramic acid. Journal of Bacteriology, 151, 420-428.
- Bart M, Guscetti F, Zurbriggen A, Pospischil A, Schiller I (2000): Feline infectious pneumonia; a short literature review and a retrospective immunohistological study on the involvement of *Chlamydia* spp and distemper virus, The Veterinary Journal, 159, 220-230.
- Becker A, Lutz-Wohlgroth L, Vaughan L, Brugnera E, Zimmermann DR, Kaps S, Spiess B, Pospischil A (2004): Chlamydial conjunctivitis in domesticated animals: preliminary results in guinea pigs, pigs and sheep. 2nd workshop of COST Action 855 and Fifth Meeting of the European Society for chlamydial research, Budapest, Hungary (Poster and presentation)
- Becker Y (1978): The chlamydia: molecular biology of procaryotic obligate parasites of eucaryotes. Microbiol Rev., 42, 274-306.
- Berger L, Volp K, Mathews S, Speare R, Timms P (1999): *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. Journal of Clinical Microbiology, 37, 2378-2380.

- Blumer C, Zimmermann DR, Weilenmann R, Vaughan L, Pospischil A (2005): Chlamydia species as possible cause of mass deaths of free-ranging amphibians and frogs in Switzerland. P. 43, Proc. 3rd COST Workshop on Diagnosis and Pathogenesis of animal chlamydioses, Siena, Italien.
- Bodetti TJ, Jacobson E, Wan C, Hafner L, Pospischil A, Rose K, Timms P (2002): Molecular evidence to support the expansion of the host range of Chlamydophila pneumoniae to include reptiles as well as humans, horses, koalas, and amphibians. Systematic Applied Microbiology, 25, 146-152.
- Bogner KH, Dünninger A, Kaleta EF (1997): Nachweis von Chlamydien bei Psittaziden aus Tupferproben mit verschiedenen Methoden. AVID-Mitteilungen, 10
- Borel N, Doherr MG, Vretou E, Psarrou E, Thoma R, Pospischil A (2002): Chlamydienabort beim Schaf: Untersuchung der Seroprävalenz in der Schweiz mittels eines kompetitiven ELISA (cELISA). Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 144, 474-482.
- Borel N, Doherr MG, Vretou E, Psarrou E, Thoma R, Pospischil A (2004): Seroprevalence for ovine enzootic abortion in Switzerland. Preventive Veterinary Medicine, 65, 205-216.
- Borel N, Thoma R, Späni P, Weilenmann R, Taenkum K, Brugnera E, Zimmermann DR, Vaughan L, Pospischil A (2006): Chlamydia-related abortions in cattle from Graubünden, Switzerland. Veterinary Pathology, im Druck.
- Borucki MK, Kurg MJ, Muraoka WT, Call DR (2003): Discrimination among Listeria monocytogenes isolates using a mixed genome DNA microarray. Veterinary Microbiology, 92, 351-362.
- Busch M, Thoma R, Schiller I, Corboz L, Pospischil A (2000): Occurrence of chlamydiae in the genital tracts of sows at slaughter and their possible significance for reproductive failure. Journal of Veterinary Medicine B, 47, 471-480.
- Butty-Favre B, Nicolet J (1987): La chlamydiose en Suisse. Etude comparative des techniques de diagnostic. Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 129, 1-13.
- Buxton D (1986): Potential danger to pregnant woman of Chlamydia psittaci from sheep. Veterinary Record, 118, 510-511.
- Call DR, Brockmann FJ, Chandler DP (2001): Detecting and genotyping Escherichia coli 0157:H7 using multiplex PCR and nucleic acid microarrays. International Journal of Food Microbiology, 67, 71-80.
- Camenisch U, Lu ZH, Vaughan L, Corboz L, Zimmermann DR, Wittenbrink MM, Pospischil A, Sydler T (2004): Diagnostic investigation into the role of Chlamydiae in cases of increased return to oestrus in pig. Veterinary Record, 155, 593-596.

- Caudill JL, Humphrey SK, Goellner JR (1994): Cervicovaginal cytology and the diagnosis of chlamydia trachomatis: a comparison with immunofluorescent results. *Diagnostic Cytopathology*, 11, 20-22.
- Chanton- Greutmann H, Thoma R, Corboz L, Borel N, Pospischil A (2002): Aborte beim kleinen Wiederkäuer in der Schweiz: Untersuchungen während zwei Ablammperioden unter besonderer Beachtung des Chlamydienabortes (1996-1998). *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 144, 483-492.
- Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G (1999): Making and reading microarrays. *Nature Genetics*, 21, 15-19.
- Chizikov V, Rasooly A, Chumakov K, Levy DD (2001): Microarray analysis for microbial virulence factors. *Applied Environmental Microbiology*, 67, 3258-3263.
- Conejero-Goldberg C, Wang E, Yi C, Goldberg TE, Jones-Brando L, Marincola FM, Webster MJ, Torrey EF (2005): Infectious pathogen detection arrays: viral detection in cell lines and postmortem brain tissue. *Biotechniques*, 39, 741-751.
- Creelan JL, Mc Cullough SJ (2000): Evaluation of strain-specific primer sequences from an abortifacient strain of ovine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci*) for the detection of EAE by PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 190, 103-108.
- Dean D (1999): Trachoma. In: Connor DH, Chandler FW, Schwartz DA, Manz HJ, Lack EE, *Pathology of infectious diseases*. Appleton and Lange, Stamford, Conn, pp 498-507.
- Dilbeck PM, Evermann JF, Crawford TB, Ward ACS, Leathers CW, Holland CJ Mebus CA, Logan LL, Rurangirwa FR, McGuire TC (1990): Isolation of a previously undescribed *Rickettsia* from an aborted bovine fetus. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 814-816.
- Everett KDE, Bush RM, Andersen AA (1999): Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam nov and Simkaniaceae fam nov, each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 415-440.
- Forster JL, Wittenbrink MM, Häni HJ, Corboz L, Pospischil A (1997): Absence of Chlamydia as an aetiology factor in aborting mares. *Veterinary Record*, 141,424.
- Frutos R, Pages M, Bellis M, Roizes G, Bergoin M (1989): Pulsed-field gel electrophoresis determination of the genome size of obligate intracellular bacteria belonging to the genera *Chlamydia*, *Rickettsiella*, and *Porochlamydia*. *Journal of Bacteriology*, 171 (8), 4511-4513.
- Fukushi H, Hirai K (1992): Proposal of *Chlamydia pecorum* sp nov for Chlamydia strains derived from ruminants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 306-308.
- Fukushi H, Hirai K (1993): *Chlamydia pecorum*-the fourth species of genus Chlamydia. *Microbiology and Immunology*, 37, 516-522.

- Grimes JE (1989): Serodiagnosis of avian Chlamydia infections. Journal of the American Veterinary medical association, 195, 1561-1564.
- Grimes JE, Wyrick PB (1991): Chlamydiosis (Ornithosis). In: Diseases of Poultry, 9th Edition, Calneck BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM, Yoder HW, Jr, Eds, Iowa State University Press, Ames, pp 311-325.
- Günther S (2004): DNA Microarray-Technologie zur Klassifizierung von Actinomyceten der Gattung *Kitasatospora*. Veterinärmedizinische Dissertation, 79 Seiten.
- Guscetti F, Bernasconi C, Tobler K, Van Reeth K, Pospischil A, Ackermann M (1998a): Immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus compared to other methods. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 5, 412-414.
- Guscetti F, Schiller I, Sydler T, Corboz L, Pospischil A (1998b): Experimental Chlamydia psittaci serotype 1 enteric infection in gnotobiotic piglets: histopathological, immunohistochemical and microbiological findings. Veterinary Microbiology, 62, 251-263.
- Guscetti F, Hoop R, Schiller I, Corboz L, Sydler T, Pospischil A (2000): Experimental enteric infection of gnotobiotic piglets with a *Chlamydia psittaci* strain of avian origin. Journal of Veterinary Medicine B Infect. Dis. Vet. Public Health, 47, 561-572.
- Hartley JC, Stevenson S, Robinson AJ, Littlewood JD, Carder c, Cartledge J, Clark C, Ridgeway GL (2001): Conjunctivitis due to Chlamydophila felis (Chlamydia psittaci feline pneumonitis agent) acquired from a cat: case report with molecular characterisation of isolates from the patient and cat. Journal of infection, 43, 7-11.
- Henning K, Sachse K, Sting R (2000): Nachweis von Chlamydien bei einem Stutenabort. Deutsche tierärztliche Wochenschrift, 107, 49-52.
- Henning K, Schares G, Granzow H, Polster U, Hartmann M, Hotzel H, Sachse K, Peters M, Rauser M (2002): Neospora caninum and Waddlia chondrophila strain 2032/99 in a septic stillborn calf. Veterinary Microbiology, 85, 285-292.
- Horn M, Wagner M, Müller KD, Schmid EN, Fritsche TR, Schleifer KH, Michel R (2000): Neochlamydia hartmanellae gen nov, sp nov (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba Hartmanella vermiformis, Microbiology, 146, 1231-1239.
- Jacobson ER, Heard D, Andersen A (2004): Identification of Chlamydophila pneumoniae in an emerald tree boa, Corallus caninus. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 16, 153-154.
- Johnson FWA (1983): Zoonoses in practice. Chlamydioses. British Veterinary Journal, 139, 93-101.
- Jorgensen DM (1997): Gestational psittacosis in a Montana sheep rancher. Emerging Infectious Diseases, 3, 191-194.

- Kaltenböck B, Schmeer N, Schneider R (1997): Evidence for numerous *omp1* alleles of porcine *Chlamydia trachomatis* and novel chlamydial species obtained by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 1835-1841.
- Kim BC, Park JH, Gu MB (2004): Development of a DNA microarray chip for the identification of sludge bacteria using an unsequenced random genomic DNA hybridisation method. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 6767-6774.
- Kingsbury DT (1969): Estimate of the genome size of various microorganisms. *Journal of Bacteriology*, 98, 1400-1401.
- Kinoshita J (2004): Pathogens as a cause of Alzheimer`s disease. *Neurobiology of Aging*, 25, 639-640.
- Laffler TG, Carrino JJ, Marshall RL (1993): The ligase chain reaction in DNA-based diagnosis. *Annales de Biologie Clinique*, 51, 821-826.
- Lander ES (1999): Array of hope. *Nature Genetics*, 21, 3-4.
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL (1996): Expression monitoring by hybridisation to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology*, 14, 1675-1680.
- Longbottom D (2004): Chlamydial infections of domestic ruminants and swine: new nomenclature and knowledge. *The Veterinary Journal*, 168, 9-11.
- Longbottom D, Coulter LJ (2003): Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology*, 128, 217-244.
- Lundemose AG, Lundemose JB, Birkelund S, Christiansen G (1989): Detection of *Chlamydia* in postmortal formalin-fixed tissue. *APMIS*, 97, 68-74.
- Lutz-Wohlgroth L, Becker A, Brugnera E, Huat ZL, Zimmermann D, Grimm F, Hässig M, Greub G, Kaps S, Spiess B, Vaughan L, Pospischil A (2006): *Chlamydiales* in guinea-pigs and their zoonotic potential. *Journal of Veterinary Medicine*, 53, 185-193.
- Marshall A, Hodgson J (1998): DNA chips: An array of possibilities. *Nature Biotechnology*, 16, 27-31.
- Meyer KF (1965): Ornithosis. In: *Diseases of Poultry*, 5th Ed, HE Biester LH Schwarte, Eds, Iowa State University Press, Ames, pp 675-770.
- Meyer KF (1967): The host spectrum of psittacosis-lymphogranuloma venerum (PL) agents. *American Journal of Ophtalmology*, 63, 1125-1246.
- Monecke S, Leube I, Ehricht R (2003): Simple and robust array-based methods for parallel detection of resistance genes of *Staphylococcus aureus*. *Genome Letters*, 2, 106-118.

- Monecke S, Ehricht R (2005): Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays. *Clin. Microbiol. Infect.*, 11, 825-833.
- Moore FM, Petrak ML (1985): Chlamydial immunoreactivity in birds with psittacosis: localization of chlamydiae by the peroxidase-antiperoxidase method. *Avian diseases*, 29, 1036-1042.
- Oldach DW, Gaydos CA, Mundy LM, Quinn TC (1993): Rapid diagnosis of *Chlamydia psittaci* pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 17, 338-343.
- Ostergaard L, Traulsen J, Birkelund S, Christiansen G (1991): Evaluation of urogenital *Chlamydia trachomatis* infections by cell culture and the polymerase chain reaction using a closed system. *European Journal of clinical microbiology and infectious diseases*, 10, 1057-1061.
- Papp JR, Shewen PE (1996): Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding. *Infection and Immunity*, 64, 1116-1125.
- Pearson JE, Gustafson GA, Senne DA, Peterson LA (1989): Isolation and identification of *Chlamydia psittaci* from pet birds. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 195, 1564-1567.
- Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, Ehricht R, Kuhnert P, Frey J (2005): Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2291-2302.
- Pollard DR, Tyler SD, Ng CW, Rozee KR (1989): A polymerase chain reaction (PCR) protocol for the specific detection of *Chlamydia* spp.. *Molecular and Cellular Probes*, 3, 383-389.
- Pospischil A, Thoma R, Hilbe M, Grest P, Zimmermann D, Gebbers JO (2002a): Abort beim Menschen durch *Chlamydia abortus*. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 144, 463-466.
- Pospischil A, Thoma R, Hilbe M, Grest P, Gebbers JO (2002b): Abortion in woman caused by caprine *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Swiss Med Wkly*, 132, 64-66.
- Pospischil A, Thoma R, von Bomhard W, Reitt K, Cantieni J, Zimmermann D, Polkinhorne A (2002c): Abort beim Rind durch *Chlamydia psittaci*. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 144, 467-472.
- Rockey DD, Lenart J, Stephens RS (2000): Genome sequencing and our understanding of chlamydiae. *Infection and Immunity*, 68, 5473-5479.
- Rodolakis A (1988): Diagnostic de la chlamydiose abortive. *Annales de Recherche Veterinaires*, 19, 213-220.

- Rodolakis A, Salinas J, Papp J (1998): Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Veterinary Research*, 29, 275-288.
- Rogers DG, Andersen AA, Hogg A, Nielsen DL, Huebert MA (1993): Conjunctivitis and keratoconjunctivitis associated with chlamydiae in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 203. 1321-1323.
- Rogers DG, Andersen AA, Hunsaker BD (1996): lung and nasal lesions caused by a swine chlamydial isolate in gnotobiotic pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8, 45-55.
- Roth SB, Jalava J, Ruuskanen O, Ruohola A, Nikkari S (2004): Use of an oligonucleotide array for laboratory diagnosis of bacteria responsible for acute upper respiratory infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4268-4274.
- Rurangirwa FR, Dilbeck PM, Crawford TB, McGuire TC, McElwain TF (1999): Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine fetus reveals that it is a member of the order Chlamydiales: proposal of Waddliaceae fam nov, Waddlia chondrophila gen nov, sp nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 577-581.
- Sachse K, Grossmann E (2002): Chlamydial diseases of domestic animals-zoonotic potential of the agent and diagnostic issues. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 109, 142-149.
- Sachse K, Hotzel H (2002): Detection and differentiation of chlamydiae by nested PCR. In: K. Sachse und J. Frey (Eds.), *Methods in Molecular Biology: PCR Detection of Microbial Pathogens*, 216, 123-136.
- Sachse K, Hotzel H, Slickers P, Ellinger T, Ehrlich R (2005): DNA microarray-based detection and identification of Chlamydia and Chlamydophila spp. *Molecular and Cellular Probes*, 19, 41-50.
- Saikku P (1999): Epidemiology of Chlamydia pneumoniae in atherosclerosis. *American Heart Journal*, 138, 500-503.
- Saikku P, Wang SP, Kleemola M, Brander E, Rusanen E, Grayston JT (1985): An epidemic of mild pneumonia due to an unusual strain of Chlamydophila psittaci. *Journal of Infectious Diseases*, 151, 832-839.
- Saikku P, Leinonen M, Mattila K, Ekman MR, Nieminen MS, Mäkelä PH, Huttunen JK, Valtonen V (1988): Serological evidence of an association of a novel Chlamydia TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet*, ii, 983-986.
- Sarov I, Becker Y (1969): Trachoma agent DNA. *Journal of Molecular Biology*, 42, 581-589.
- Schachter J (1988): Overview of human diseases. In: *Microbiology of Chlamydia*, AL Barron, Ed, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 153-165.

- Schachter J (1990): Chlamydial Infections. The Western Journal of Medicine, 153, 523-534.
- Schachter J (1991): Chlamydiae. In: Manual of clinical Microbiology, 5. Ausgabe. Balows VS, Hermann WJ, Isenberg HD, Shedomy HJ, American Society for Microbiology, Washington, D. C., p. 1045-1053.
- Schachter J (1999): Infection and disease epidemiology. In: Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity, RS Stephens, Ed, ASM Press, Washington, DC, pp 139-169.
- Schachter J, Ostler HB, Meyer KF (1969): Human infection with the agent of feline pneumonitis. Lancet, i, 1063-1065.
- Schachter J, Stamm WE, Quinn TC, Andrews WW, Burczak JD, Lee HH (1994): Ligase chain reaction to detect Chlamydia trachomatis infection of the cervix. Journal of Clinical Microbiology, 32, 2540-2543.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 270, 467-470.
- Soldati G, Lu ZH, Vaughan L, Polkinghorne A, Zimmermann DR, Huder JB, Pospischil A (2004): Detection of Mycobacteria and Chlamydiae in granulomatous inflammation of reptiles: a retrospective study. Veterinary Pathology, 41, 388-397.
- Southern EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology, 98, 503-517.
- Späni P, Pospischil A, Thoma R, Weilenmann R, Zimmermann DR, Brugnera E, Vaughan L, Borel N (2005): Chlamydia related abortion in cattle: preliminary results. 2nd Workshop of COST Action 855, Budapest, Hungary.
- Späni P, Pospischil A, Thoma R, Weilenmann R, Zimmermann DR, Brugnera E, Vaughan L, Borel N (2005): Chlamydia related abortion in cattle. 38. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 30. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, Zürich, Schweiz.
- Stamp JT, McEwen AD, Watt JAA, Nisbet DI (1950): Enzootic abortion in ewes. I. Transmission of the disease. Veterinary Record, 62, 251-254.
- Storey C, Lusher M, Yates P, Richmond S (1993): Evidence for Chlamydia pneumoniae of non-human origin. Journal of General Microbiology, 139, 2621-2626.
- Storz J (1988): Overview of animal diseases induced by chlamydial infections. In: Microbiology of Chlamydia, AL Barron, Ed, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 167-192.
- Storz J, Carroll EJ, Ball L, Faulkner LC (1968): Isolation of a psittacosis agent (Chlamydia) from semen and epididymis of bulls with seminal vesiculitis syndrome. American Journal of Veterinary Research, 29, 549-555.

- Storz J, Carroll EJ, Stephenson EH, Ball L, Eugster AK (1976): Urogenital infection and seminal excretion after inoculation of bulls and rams with chlamydiae. *American Journal of Veterinary Research*, 37, 517-520.
- Storz J, Kaltenböck B (1993): Diversity of chlamydia-induced diseases. Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals. Ed Z Woldehiwet, M Ristic Pergamon Press Ltd, Oxford, 363-393.
- Straumann-Kunz U, Pospischil A, Paccaud MF (1991): Immunohistochemical detection of Chlamydiae in Formalin-fixed tissue sections: Comparison of a monoclonal antibody with yolk derived antibodies (IgY). *Journal of Veterinary Medicine*, B38, 292-298.
- Sykes JE (2001): Feline upper respiratory tract pathogens: Chlamydomphila felis. compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, 23, 231-240.
- Szeredi L, Schiller I, Sydler T, Guscetti F, Heinen E, Corboz L, Eggenberger E, Jones GE, Pospischil A (1996): Intestinal Chlamydia in finishing pigs. *Veterinary Pathology*, 33, 369-374.
- Taday E.M.A (1998): Organveränderungen und Erregernachweise nach Infektionen mit *Chlamydia* spp. beim Vogel unter besonderer Berücksichtigung des aviären Wirtsspektrums. Universität Giessen, Veterinärmedizinische Dissertation, 184 Seiten.
- Teankum K, Borel N, Janett F, Vaughan L, Brungnera E, Bürgi E, Corboz L, Weilenmann R, Kaiser C, Pospischil A (2004): Detection of Chlamydia species in male genital tract of ruminants and pigs: preliminary results. 2nd Workshop of COST Action 855, Budapest, Hungary (poster).
- Teankum K, Janett F, Vaughan L, Brungnera E, Bürgi E, Corboz L, Weilenmann R, Kaiser C, Pospischil A, Borel N (2005): Detection of Chlamydia species in semen and male genital tracts of ruminants and pigs. 38. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 30. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung, Zürich, Schweiz (Präsentation).
- Theil D, Hoop R, Herring AJ, Pospischil A (1996): Detection of Chlamydia in formalin-fixed and paraffin-embedded avian tissue by in situ hybridisation. A comparison between in situ hybridisation and peroxidase-antiperoxidase labelling. *Journal of Veterinary Medicine*, 43, 365-370.
- Thoma R, Corboz L, Pospischil A (1997a): Chlamydial and Toxoplasma infections: Chief infectious causes in sheep and goat abortion in Switzerland. Proceedings from the 15th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology. Sassari-Alghero, 16-19 September.
- Thoma R, Guscetti F, Schiller I, Schmeer N, Corboz L, Pospischil A (1997b): Chlamydiae in porcine abortion. *Veterinary Pathology*, 34, 467-469.
- Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, Desvarenne S, Gingeras TR, Kaplan PM, Cros P, Mabilat C (1999): Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe array. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 49-55.

- Vanrompay D, Ducatelle R, Haesebrouck F (1995): Chlamydia psittaci infections: a review with emphasis on avian chlamydiosis. *Veterinary Microbiology*, 45, 93-119.
- Viscidi RP, Bobo L, Hook EW 3rd, Quinn TC (1993): Transmission of Chlamydia trachomatis among sex partners assessed by polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases*, 168, 488-492.
- Vogels WH, van Voorst Vader PC, Schroder FP (1993): Chlamydia trachomatis infection in a high-risk population: comparison of polymerase chain reaction and cell culture for diagnosis and follow-up. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1103-1107.
- Von Bomhard W, Polkinhorne A, Lu ZH, Vaughan L, Vögtlin A, Zimmermann DR, Spiess B, Pospischil A (2003): Detection of novel chlamydiae in cats with ocular disease. *American Journal of Veterinary Research*, 64, 1421-1428.
- Wang SP (1971): A microimmunofluorescence method. Study of antibody response to TRIC organisms in mice. *Excerpta Medica*, 273-288.
- Watson JD, Crick FH (1953): Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Annals of Internal Medicine*, 138 (7), 581-582.
- Wills JM, Watson G, Lusher M, Mair TS, Wood D, Richmond SJ (1990): Characterisation of Chlamydia psittaci isolates from a horse. *Veterinary Microbiology*, 24, 11-19.
- Wilsmore AJ, Parson V, Dawson M (1984): Experiments to demonstrate routes of transmission of ovine enzootic abortion. *British Veterinary Journal*, 140, 380-391.
- Wilson WJ, Strout CL, DeSantis TZ, Stilwell JL, Carrano AV, Andersen GL (2002): Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Molecular and Cellular Probes*, 16, 119-127.
- Wittenbrink MM, Peter U, Bisping W (1987): The occurrence of latent intestinal Chlamydia psittaci infection in cattle. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 100 (11), 377-381.

VIII Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei allen bedanken, die zu dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere sind das:

Prof. Dr. A. Pospischil für die Übernahme des Referates

Prof. Dr. R. Hoop für die Übernahme des Korreferates

Dr. N. Borel, Institut für Veterinärpathologie IVPZ, für die hervorragende Betreuung und die unendliche Geduld die sie mir entgegengebracht hat

R. Weilenmann und dem Laborpersonal des IVPZ

Allen Mitarbeitern des IVPZ

Der ganzen Abteilung des Institutes für Veterinärbakteriologie, ganz besonders

Prof. Dr. M. Wittenbrink, Dr. K. Hölzle, Dr. L. Hölzle aus dem Institut für Veterinärbakteriologie Zürich

Dr. Paul Torgenson, aus dem Institut für Veterinärparasitologie Zürich, für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen

Dr. Ralf Ehricht, Firma Clondiag in Jena

Dr. Konrad Sachse, Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsanstalt für Tiergesundheit in Jena

Dr. Taurai Tasara aus dem Institut für Lebensmittelhygiene

Und natürlich meine ganze Familie, meine Eltern und mein geliebter Ehemann

IX Lebenslauf

Name: Evelyne Winter-Kempf
Geburtsdatum: 11.7.1979 in Winterthur
Heimatort: Altdorf UR

1986-1992: Primarschule Pfäffikon (SZ)

1992-1998: Gymnasium (Matura Typ A) an der Stiftschule Kloster Einsiedeln

1998-2004: Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich

Oktober 2004: Abschluss des Studiums (Staatsexamen) an der Universität Zürich

2005-2006: Doktorandin und Assistenztierärztin am Institut für Veterinärpathologie Zürich (IVPZ)

seit Okt. 2006: Assistenztierärztin an der Tierklinik Masans in Chur

Au, den 11. 10. 2006